Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der Bitterstoffe in der Lactuca-virosa-Pflanze

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Otto Woköck

aus Danzig

1966

Untersuchungen zur quantitativen Bestimmung der Bitterstoffe in der Lactuca-virosa-Pflanze

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

vorgelegt von

Otto Woköck

aus Danzig

1. Referent: Prof. Dr. G. Schenck
2. Referent: Prof. Dr. R. Hänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 15.6.1966
Tag der Promotion: 16. JULI 1966

Die vorliegende Arbeit wurde am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Schenck angefertigt.

Meinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. Gerhard Schenck danke ich aufrichtig für sein Wohlwollen und Interesse, das er mir und meiner Arbeit stets zuteil werden ließ.

Herrn Prof. Dr. Helmut Loth danke ich herzlich für seine Bereitschaft zur Diskussion meiner Probleme, für wertvolle Hinweise und Unterstützung beim Literaturstudium.

Den Herren Dr. M. Huke und Dr. F. Walter danke ich für die freundliche Überlassung von Dihydro- und Hexahydrolactucin.

Ich danke Fräulein D. Hartleb für die aufmerksame und sorgfältige Mithilfe bei der Durchführung von Versuchen.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535704_0073

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
B	ALLGEMEINER TEIL	4
I.	Die Herstellung der Bitterstoffe Lactucopikrin und Lactucin	4
	1. Die Herstellung von Lactucopikrin	5
	2. Die Herstellung von Lactucin	5
II.	Papierchromatographische Untersuchungen von Lactuca-virosa-Auszügen zum Nachweis von Lactucin, Lactucopikrin und anderer TTC-reduzierender Pflanzeninhaltsstoffe	7
	1. Papierchromatographische Untersuchungen von wässrigen Lactuca-virosa-Auszügen	8
	2. Papierchromatographische Untersuchungen von Methanol-Extrakten	11
	3. Zusammenfassung und Ergebnisse	14
III.	Die quantitative Bestimmung der Bitterstoffe mit Tetrazoliumsalzen	15
	1. Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Steroid-Bestimmungsmethoden mit TTC	16
	a) Elution von Formazan-Flecken	16
	b) TTC-Reaktion in Eluaten	16
	c) Arzneibuchverfahren (U.S.P.XVI)	17
	2. Versuche zur Änderung des Verfahrens Nr. 2 - TTC-Reaktion in alkoholischer Lösung	17
	a) Wahl des Lösungsmittels	17
	b) Einfluß des Alkalis	17
	c) Bestimmungsmethode mit TTC in Aethanol-Essigester	18
	d) Ergebnisse	18
	3. Untersuchungen mit Blautetrazol	19
	a) Die Löslichkeit des Blauformazans	20
	b) Die Formazan-Bildung in Abhängigkeit vom pH	20
	c) Der Einfluß des Lichtes auf die Formazan-Abscheidung	22
	d) Der Einfluß des Tageslichtes auf Blauformazan-Tetrahydrofuranlösungen	23
	e) Der Einfluß von Temperatur und Zeit auf die Reaktionsgeschwindigkeit und die Formazan-Abscheidung	23
	f) Prüfung der Reaktionsdauer bei höheren Lactucin-Konzentrationen	24
	g) Änderung der Blautetrazol-Konzentration	25
	h) Zusammenfassung	25

Seite

4. Lactucin-Bestimmung mit Blautetrazol in Stickstoffatmosphäre 26

a) Untersuchungen mit Stickstoff 27
b) Doppelte Begasung 27
c) Zusammenfassung 29

5. Die quantitative Bestimmung von Lactucopikrin mit Blautetrazol 30

6. Die Begründung der Ursache der positiven TTC-Reaktion von Lactucin und das Ausbleiben dieser Reaktion in alkalischen Lactucinlösungen 30

7. Zusammenfassung und Ergebnisse 32

IV. Die säulenchromatographische Trennung von Lactucin und Lactucopikrin 33

1. Kieselgel als Sorbens 33

2. Aluminiumoxyd stand. n.Brockmann als Sorbens 33

3. Aluminiumoxyd neutral als Sorbens 34

4. Aluminiumoxyd sauer als Sorbens 35

5. Zusammenfassung und Ergebnisse 36

V. Die Veränderung von Lactucin und Lactucopikrin durch Methanol und Azeton 37

1. Die Reaktion von Methanol mit Lactucopikrin und Lactucin 37

a) Die Dunkelreaktion 37
b) Die Lichtreaktion 38

2. Die Veränderungen von Lactucopikrin und Lactucin in Azeton bei Tageslicht 38

3. Zusammenfassung und Ergebnisse 39

VI. Extraktion von Lactucin und Lactucopikrin aus Blättern von Lactuca virosa L. - Trennung der Bitterstoffe 41

1. Veränderungen der Bitterstoffe in Tinkturen 41

2. Herstellung von Trockenextrakten 41

a) Ermittlung der Extraktionsvolumina 42
b) Entfernung des Chlorophylls 42
c) Entfernung der Bitterstoffe aus der Chlorophyll-Petrolaether-Phase 43
d) Zusammenfassung 43

Seite

3. Säulenchromatographische Auftrennung des Trockenextraktes 43

a) Chromatographie von Azeton-Wasserlösungen des Trockenextraktes an Aluminiumoxyd 44
b) Essigesterausschüttelung der wässrigen Lösung des Trockenextraktes 44
c) Chromatographie der Essigesterlösung 44
d) Perforation und Säulentrennung mit Äther 45
e) Entfernung des ätherunlöslichen Anteils des Trockenextraktes durch Auswaschen 46
f) Beseitigung des ätherunlöslichen Anteils durch Ausfällen 46
g) Untersuchungen über die Veränderungen der Bitterstoffe bei der Trennung 47
h) Bitterstoffveränderung durch Wärme 48
i) Zusammenfassung 48

VII. Zusammenfassung 50

VIII. Neue Probleme 51

C EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herstellung der Substanzen 52

1. Herstellung von Lactucopikrin 52

2. Herstellung von Lactucin 52

II. Beschreibung der Versuchsanordnung 54

1. Chromatographische Verfahren 54

a) Papierchromatographie 54
b) Dünnschichtchromatographie 54
c) Detektion 54
d) Vorreinigung von Pflanzenauszügen zur DC-Untersuchung 55
e) Trennung der Bitterstoffe an saurem Aluminiumoxyd 55

2. Lösungen für die quantitative Bitterstoffbestimmung mit Blautetrazol 56

a) Herstellung von wässrigen Lactucinlösungen 56
b) Herstellung von wässrigen Lactucopikrinlösungen 56
c) Blautetrazollösung 56
d) Pufferlösung 56

3. Versuchsanordnung für die Begasung mit Stickstoff 57

4. Spektralphotometer und Formeln für die Berechnung der Abweichungen 57

Seite

5. Aufstellung einer Eichgeraden zur Bestimmung von Lactucin 57

6. Aufstellung einer Eichgeraden zur Bestimmung von Lactucopikrin 59

7. Extraktion von Lactuca-virosa-Blättern 60

8. Vorbereitung von Blattauszügen für die Säulenchromatographie 60

D LITERATURVERZEICHNIS 61

A Einleitung und Problemstellung

Seit dem Altertum wird von der sedativen Wirkung des Giftlattichs (Lactuca virosa L., Compositae) berichtet. (1) Zur Anwendung gelangten Kraut, Samen und vor allen Dingen der getrocknete Milchsaft, das Lactucarium. Dieses wurde schon früh mit dem Opium in enge Beziehung gebracht, wofür die Bezeichnungen "Lactuca meconida" (PLINIUS, GALEN) und "Lettuce opium" (COXE 1799) sprechen (2). Das Lactucarium gehörte in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts zu den wichtigsten Arzneimitteln. (1) Es wurde als hustenreizstillendes und schlafmachendes Mittel verwandt, verlor dann an Bedeutung und wurde 1890 nicht mehr in das Deutsche Arzneibuch (3. Ausgabe) aufgenommen.
Das Lactucarium wird jedoch noch in der 5. Ausgabe des Ergänzungsbuchs zum Deutschen Arzneibuch aufgeführt (1930) und wurde ab 1930 wieder Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen.
FRONMÜLLER (3) war bereits 1862 der Ansicht, daß das Lactucarium von unterschiedlichem Wirkungsgrad sei und benutzte als Hypnotikum den 1833 in unreiner Form isolierten Bitterstoff Lactucin. A. BUCHNER, von dem die Isolierung des Lactucins durchgeführt worden war, sprach auch die Vermutung aus, daß das sedative Prinzip der Lactuca virosa in diesem Bitterstoff zu finden sei. (4)

Im Jahre 1937 bestätigte der Pharmakologe A.W.FORST (1) die unterschiedliche Wirkung von Lactucarium verschiedener Provenienzien. Er führte daher seine Untersuchungen mit den reinen Bitterstoffen Lactucin und Lactucopikrin durch. Lactucopikrin, der zweite Bitterstoff aus Lactuca virosa L., wurde zur selben Zeit erstmals von G. SCHENCK und H. GRAF rein dargestellt (5). In unreiner Form wurde es 1862 von H. LUDWIG und A. KROHMAYER isoliert (6). A.W. FORST bestätigte die Vermutungen von A. BUCHNER (4), indem er die sedative Wirkung der Bitterstoffe durch pharmakologische Prüfmethoden an Tieren bewies. Lactucopikrin besitzt nur ein Fünftel der Wirksamkeit des Lactucins. Beide Bitterstoffe erwiesen sich als ungiftig.

Die Strukturaufklärung des Lactucins ($C_{15}H_{16}O_5$; Mol.-Gew.: 276,3) erfolgte 1958 in unabhängiger Arbeit von D.H.R. BARTON und C.R. NARAYANAN (7) sowie von L. DOLEJS, V.HEROUT und F. SORM (8). Lactucin ist ein Sesquiterpen des Guaianolid-Typs:

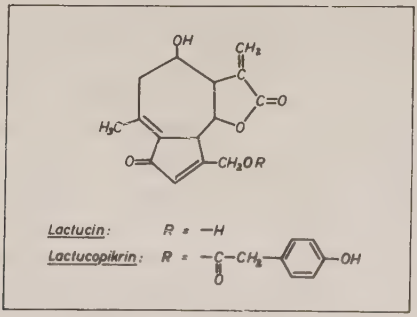


Abb. 1

Lactucopikrin ($C_{23}H_{22}O_7$; Mol.-Gew.: 410,2) wurde von K. HOLZER und A. ZINKE (9) sowie von H. MICHL und G. HÖGENAUER (10) als der Lactucinmonoester der 4-Hydroxyphenylessigsäure erkannt.

G.SCHENCK und H. GRAF führten die unterschiedliche Wirksamkeit des Lactucariums auf eine Zerstörung der Bitterstoffe bei seiner Herstellung zurück. Nach Studium der im Anbaugebiet von Lactuca vir. üblichen Bereitungsverfahren entwickelten sie eine schonende Methode, die zur Herstellung eines haltbaren, wasserlöslichen und standardisierbaren Milchsaftpräparates, dem Lactucyl, führte (11).

Die Zerstörung von Lactucin und Lactucopikrin bei der Milchsaftgewinnung erfolgt nach G.SCHENCK und H. GRAF (11) durch Oxydation unter Mitwirkung von Sonnenlicht und oxydierenden Fermenten, deren Vorkommen im Milchsaft von Lactuca vir. G. SCHENCK und H. GRAF (11) sowie H.BAUER und K.BRUNNER (12) nachgewiesen haben.

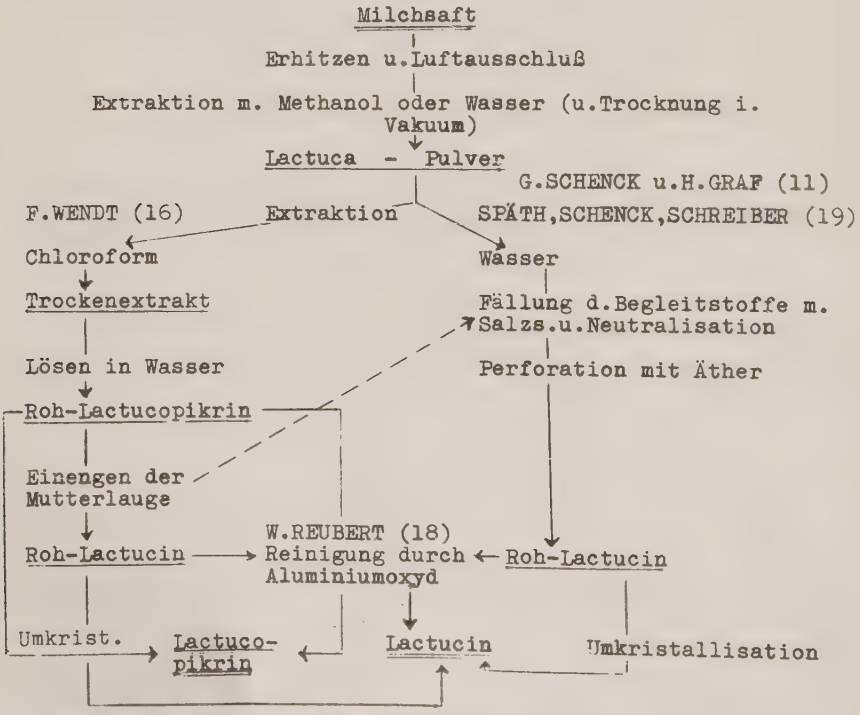
Lactucopikrin wird nach den Untersuchungen von F.WALTER (19) durch das Ferment Peroxydase, dessen Aktivität im Milchsaft von Lactuca vir. von A. SCHMITT (14) bestimmt wurde, oxydativ verändert.
Lactucin erleidet, wie H.E. SELL feststellte, keine Veränderungen durch dieses Ferment (15). Es wird jedoch nach TH.NAUMANN (16) durch Sonnenlicht zerstört.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine Methode zur quantitativen Bestimmung von Lactucin und Lactucopikrin ausgearbeitet werden, um den Gehalt an Bitterstoffen in Lactuca-virosa-Pflanzen bestimmen zu können.

B ALLGEMEINER TEIL

I. Die Herstellung der Bitterstoffe Lactucopikrin und Lactucin

Die für unsere Untersuchungen erforderlichen Bitterstoffe Lactucin und Lactucopikrin wurden aus einem Trockenextrakt isoliert, der nach F.WENDT (16) aus "Lactuca-Trockenpulver" hergestellt wurde. Das "Lactuca-Trockenpulver" ist ein sprühgetrockneter Extrakt, der nach einem patentierten Verfahren nach G.SCHENCK und H.GRAF aus dem Milchsaft von Lactuca virosa L. gewonnen wird.
Das unten angegebene Schema soll kurz die Gewinnungsverfahren der Bitterstoffe wiedergeben:



Schema der Verfahren zur Gewinnung der Bitterstoffe Lactucin und Lactucopikrin

1. Die Herstellung von Lactucopikrin nach F.WENDT (16)

Der durch Chloroformextraktion des "Lactuca-Trockenpulver" gewonnene Trockenextrakt wurde in der 1000-fachen Menge heißem Wasser gelöst. Nach Filtration und Erkalten der Lösung kristallisierte das Lactucopikrin aus. Das so gewonnene Lactucopikrin schmolz bei 144-145° (Kofler-Heiztischmikroskop) und konnte durch Filtration über saurem Aluminiumoxyd nach W.REUBERT gereinigt werden (18).
Auf Grund unserer im Kapitel IV beschriebenen Versuche verwandten wir, abweichend von der Methode nach W.REUBERT (18), saures Aluminiumoxyd zur Reinigung von Lactucin und Lactucopikrin.
Fp.150-151° (unter Zersetzung). Der molare Extinktionskoeffizient, gemessen in Aethanol (95 %) bei λ max. 256nm, betrug ε = 15859. Der Rf-Wert betrug bei papierchromatischen Untersuchungen nach W.REUBERT (18) 0,49.

2. Die Herstellung von Lactucin

Bei der Isolierung von Lactucin aus der Lactucopikrin-Mutterlauge nach F.WENDT (16) konnten nur geringe Ausbeuten erzielt werden, da dieser Bitterstoff nicht aus der konzentrierten Mutterlauge auskristallisierte. Die Mutterlauge wurde eingedampft und der Rückstand in wenig heißem Wasser gelöst. Die in der Kälte ausgefallenen Kristalle wurden 2 mal aus Wasser umkristallisiert und nach W.REUBERT (18) mit Aktivkohle und saurem Aluminiumoxyd gereinigt. Aus 900mg dunkelbraunem Rohlactucin wurden 30 mg farbloses Lactucin mit dem Fp.219-220° erhalten.
Wegen der hohen Bitterstoffverluste wurden andere Verfahren untersucht. Die Vorschrift von E.SPÄTH, G.SCHENCK und W. SCHREBER (19), nach der Lactucin allein aus "Lactuca-Pulver" gewonnen wird, konnte wegen des damit verbundenen Verlustes an Lactucopikrin nicht durchgeführt werden. Es wurde deshalb die Methode von F.WENDT (16) mit der von E.SPÄTH, G.SCHENCK und W.SCHREBER (19) kombiniert. Die zuletzt genannten Autoren behandelten einen wässrigen Auszug von "Lactuca-Pulver"

mit rauchender Salzsäure und extrahierten aus der mit Natriumbikarbonat und Kochsalz versetzten Lösung mit Äther das Lactucin. Nach unseren Untersuchungen wird bei diesem Verfahren das Lactucopikrin zerstört.
Das so aus der bei der Lactucopikringewinnung anfallenden Mutterlauge in genügender Ausbeute gewonnene Lactucin war von hellgelber Farbe und schmolz zwischen 208 und 210°.

Nach Behandlung mit Aktivkohle und Filtration der wässrigen Lösung durch "Aluminiumoxid-Woelm-sauer" wurde farbloses Lactucin erhalten. Fp.: 219-220° (u.Zers.), Rf-Wert: 0,75 (5%ige Essigsäure/S.u.S.2043 bm/aufsteigend), ε (λ max.265nm, Aethanol 95% v/v): 14176.

II. Papierchromatographische Untersuchungen von Lactuca virosa-Auszügen zum Nachweis von Lactucin, Lactucopikrin und anderer TTC reduzierender Pflanzeninhaltstoffe

Für den gemeinsamen qualitativen Nachweis von Lactucin und Lactucopikrin werden die Braunfärbung bei Behandlung mit Alkalien (20) (21) und die Rotfärbung bei Behandlung mit Zink und Salzsäure beschrieben (21). Diese Reaktionen werden auch für quantitative photometrische Bestimmungen benutzt. (21) (22) Hierbei handelt es sich jedoch nicht um bitterstoffspezifische Reaktionen. Diese Reaktionen werden auch von Flavonoiden gegeben, deren Existenz W. REUBERT in Sprossextrakten von Lactuca vir. nachgewiesen hat. (18)

Wir suchten deshalb nach Farbreaktionen, die für die Bitterstoffe spezifisch genug sind, um der quantitativen photometrischen Bestimmung möglichst wenige Reinigungsschritte vorangehen zu lassen.
Eine intensive rote Färbung entsteht beim Besprühen von Bitterstofflecken eines Papierchromatogrammes mit alkalischer 2,3,5-Tri-phenyl-tetrazolium-chlorid-Lösung (TTC) (18). Dieses Reagenz ist in 0,5-1n Laugen ein für α-Ketole spezifisches Oxydationsmittel (23) und ist in seiner reduzierten Form, dem Tri-phenyl-formazan, rot. Es wird u.a. zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von reduzierenden Zuckern und 17-Ketosteroiden benutzt. Das selektive Oxydationsvermögen und die Tatsache, daß dieses Reagenz bereits für quantitative Bestimmungen benutzt wurde, bewog uns, seine Brauchbarkeit für eine quantitative Bitterstoffbestimmung zu prüfen.

Eigene Versuche

Wir untersuchten zuerst wässrige und methanolische Blatt- und Stengelextrakte von Lactuca vir. L., um festzustellen, ob außer den Bitterstoffen auch andere Pflanzeninhaltsstoffe der Lactuca-vir.-Pflanze TTC zu reduzieren vermögen.

1. Papierchromatographische Untersuchungen von wässrigen Lactuca-virosa-Auszügen

Als Ausgangsmaterial für unsere Untersuchungen diente zunächst der Pressaft aus frischen Lactuca-vir.-Blättern und -Stengeln. Hiervon wurden für die Papierchromatographie bis 0,03 ml auf einen Startfleck aufgetragen. Beim Auftragen größerer Volumina verklebte das Papier und nahm keine Flüssigkeit mehr auf. Als Laufmittel wurden die beiden, von W. REUBERT für den Bitterstoffnachweis benutzten Systeme Essigsäure/Wasser (5:95 v/v) und Methanol/Wasser (40:60 v/v) verwandt. (18) Das Laufmittel Methanol/Wasser eignete sich nicht zur Papierchromatographie des Pressaftes: es bildeten sich vom Start her Schwänze, die in der ganzen Länge eine positive TTC-Reaktion gaben. Wurde der Pressaft zusammen mit reinen Bitterstoffen chromatographiert, trat der gleiche Effekt auf.
Bei der Verwendung des Systems Essigsäure/Wasser wurden auf dem PC 4 Flecke entwickelt, von denen einer eine positive TTC-Reaktion gab. Er lag in der Höhe des Rf-Wertes des Vergleichslactucins,das zusammen mit Pressaft gelaufen war (Rf.:0,65), und gab auch wie dieses im kurzwelligen UV-Licht von 254nm eine rötliche Fluoreszenz. Auf dem gleichen PC ließen wir ein Gemisch aus identischen Bitterstoffen und Pressaft mitlaufen. Die Rf-Werte waren niedriger als die von Reinsubstanzen:

Rf-Werte von: Lactucin : 0,75; Rf-Werte von: Lactucopikrin : 0,49

Rf-Werte von: Lactucin mit Pressaft : 0,65; Rf-Werte von: Lactucopikrin mit Pressaft : 0,36

Im Lactuca-vir.-Pressaft konnten wir papierchromatographisch nur eine Substanz finden, die eine positive TTC-Reaktion gab. Wir vermuteten auf Grund des Rf-Wertes und der Fluoreszenz, daß es sich um Lactucin handelte.
Um größere Mengen von Pflanzenextrakten auf das Papier auftragen zu können, führten wir Versuche mit Lactuca-Urtinktur (Lactuca-Ø) durch. Diese wurde nach Vorschrift des Homöopa-

thischen Arzneibuches hergestellt. (40) Beim Auftragen dieser Lösung auf den Startfleck traten keine Verklebungen auf, und es konnten größere Volumina (0,1 ml) als bei der Papierchromatographie des Pressaftes aufgetragen werden. Es wurden auf dem PC (Laufmittel: Methanol/Wasser 40%) 2 im UV-Licht (254 nm) fluoreszierende Flecke entwickelt, von denen einer mit TTC reagierte. Die UV-Fluoreszenz dieses Fleckes war jedoch hellblau, und seine im UV-Licht markierten Umrisse waren größer als der Formazan-Fleck. Dieser Fleck bestand also aus 2 oder mehreren Komponenten. Wurde der Urtinktur identisches Lactucin zugegeben, so entstand auf dem PC ebenfalls nur ein TTC-positiver Fleck, dessen Rf-Wert (0,69) mit dem TTC-positiven Fleck der Urtinktur übereinstimmte. Wurden der Urtinktur beide Bitterstoffe zugegeben, so zeigte das Chromatogramm 2 Formazan-Flecke. Wie beim Pressaft waren hier ebenfalls die Rf-Werte von Lactucin und Lactucopikrin deprimiert, wenn sie zusammen mit Lactuca-Urtinktur chromatographiert wurden.

Laufmittel: Methanol/Wasser 40% (v/v)

Rf-Werte	: Lactucin	: 0,75	Lactucin + Ø	: 0,69
Rf-Werte	: Lactucopikrin	: 0,60	Lactucopikrin + Ø	: 0,54

Aus diesen Beobachtungen konnten wir schließen, daß in der Lactuca-Urtinktur ebenso wie im Pressaft kein Lactucopikrin enthalten war, und daß der Rf der Bitterstoffe durch andere Pflanzeninhaltsstoffe verändert wird. Im Falle der Lactuca-Urtinktur konnten wir nicht beweisen, daß die positive Reaktion des Fleckes mit dem Rf-Wert 0,69 allein vom Lactucin verursacht wird, denn es bestand die Möglichkeit, daß die im UV-Licht hellblau fluoreszierende Substanz die gleiche Reaktion gab.

Es war also notwendig, die Begleitstoffe zu entfernen. Wir versuchten dieses durch Adsorption an Aluminiumoxyd zu erreichen und filtrierten Pressaft, der mit gleichen Teilen Wasser versetzt worden war, durch saures Aluminiumoxyd. Wir erhielten aus einer rotbraunen Lösung ein schwach gelblich gefärbtes Filtrat, in dem wir papierchromatographisch nur eine TTC-positive Substanz fanden. (Laufmittel:

Essigsäure 5 %). Der Rf-Wert dieser Substanz stimmte genau mit dem Rf von Lactucin überein und blieb gleich, als wir das Filtrat zusammen mit authentischem Lactucin und Lactucopikrin chromatographierten.

Zusammenfassung

Wässrige Auszüge von Lactuca virosa enthielten nach Aluminiumoxyd-Vorreinigung nur eine TTC-positive Substanz. Diese wurde papierchromatographisch als Lactucin erkannt. Durch Filtration des Pflanzensaftes durch saures Aluminiumoxyd konnten Substanzen entfernt werden, die die Papierchromatographie von wässrigen Lactuca-vir.-Auszügen störten, weil sie entweder den Startfleck verklebten oder die Rf-Werte der Bitterstoffe veränderten.
Die folgenden Untersuchungen sollten das Problem lösen, wie beide Bitterstoffe als Lactuca-virosa-Pflanzen extrahiert werden können.

2. Papierchromatographische Untersuchungen von Methanol-Extrakten

Bei unseren Untersuchungen von wässrigen Lactuca-virosa-Auszügen vermißten wir auf den Papierchromatogrammen einen zweiten Fleck mit einer positiven TTC-Reaktion: den des Lactucopikrins.
Diese Beobachtung war jedoch nicht neu: REMPEN (24) stellte ebenfalls in der Lactuca-Urtinktur das Fehlen von Lactucopikrin fest. REUBERT (18) gelang es nicht, in wässrigen und methanolischen Lactuca-Auszügen Lactucopikrin nachzuweisen. Er vermutete eine Zerstörung dieses Bitterstoffes durch oxydierende Fermente des Milchsaftes, deren Existenz von G.SCHENCK und H. GRAF (11), sowie von K.H. BAUER und K.BRUNNER (12) nachgewiesen worden war.- F.WALTER (13) bewies später durch in-vitro-Versuche, daß Lactucopikrin von dem im Milchsaft von Lactuca virosa L. enthaltenen Enzym Peroxydase oxydiert wird.- REUBERT extrahierte das Pflanzenmaterial mit salzsaurem Methanol, um so bei der Extraktion zugleich die Fermente zu inhibieren. Im salzsauren Methanolauszug konnte er papierchromatographisch Lactucopikrin nachweisen (18).
Bei der Papierchromatographie von solchen Lactuca-Auszügen (Laufmittel: 5%ige Essigsäure) konnten wir 2 TTC-positive Flecke beobachten, deren Rf-Werte jedoch nicht mit denen von reinen Bitterstoffen übereinstimmten. Außerdem waren 6-8 Flecke zu beobachten, die im kurzwelligen UV-Licht gelb und blau fluoreszierten. Nach Filtration durch saures Aluminiumoxyd befanden sich außer den Bitterstofflecken nur noch 2-3 im UV-Licht (254nm) gelb und hellblau fluoreszierende Flecke auf den PC. Sie überlappten allerdings die Bitterstofflecke, so daß die Lokalisierung und Identifizierung durch ihre rot-violette UV-Fluoreszenz nicht immer eindeutig war. Nach Besprühen mit alkalischer TTC-Lösung wurde völlige Übereinstimmung mit den Rf-Werten von Vergleichs-Bitterstoffen festgestellt.
Durch ein Versehen gelangten wir zu einer anderen Extraktionsmethode. Als bei einem Extraktionsansatz der Salzsäurezusatz vergessen wurde, konnten wir wider Erwarten beide

Bitterstoffe nachweisen. Diese Nachweise waren reproduzierbar. Daraufhin unterließen wir den Salzsäurezusatz. Wir änderten außerdem das von REUBERT angegebene Ansatzverhältnis von einem Gewichtsteil Frischdroge zu 2 Teilen 50%igem Methanol auf 1 : 5 und benutzten reinen Methanol. So konnte die Zerkleinerung von Pflanzenteilen in der Küchenmaschine besser durchgeführt werden und das Lösungsmittel leichter abgezogen werden. Die hohe Methanolkonzentration sollte die Inaktivierung von Fermenten gewährleisten.

Auch bei dieser Extraktionsweise konnten auf dem PC (Essigsäure 5 % als Laufmittel) stets nur Lactucin und Lactucopikrin als einzige TTC-positive Substanzen gefunden werden. Die Papierchromatogramme glichen denen von salzsauren Auszügen.

Wurde die Papierchromatographie der vorgereinigten Methanol-Extrakte mit 40%igem Methanol durchgeführt, dann trat nur ein TTC-positiver Fleck auf, selbst dann, wenn dem Auszug beide Bitterstoffe zugefügt worden waren. Auf Grund seiner schlechten Trenneigenschaft wurde dieses Laufmittel nicht mehr von uns benutzt.

Wir untersuchten die methanolischen Extrakte mit einem anderen Laufmittel, um sicher zu sein, eine vollständige Trennung durchgeführt zu haben. Mit butylazetat-haltigem, einphasigem Partridge-Laufmittel (15) wurde eine gute Trennung erhalten. Der Chromatographie ging auch hier eine Filtration durch Aluminiumoxyd voraus. Als einzige Substanzen reagierten auf dem PC die Bitterstoffe TTC-positiv. Sie konnten in diesem Falle auch durch ihre Fluoreszenz erkannt werden, da sie nicht von anderen Flecken überlappt wurden. Die Entwicklungszeit dieser Chromatogramme dauerte mit Sättigung 22 Stunden.

Wir konnten somit beide Bitterstoffe in Lactuca vir.-Blättern und -Stengeln nachweisen. Andere TTC-reduzierende Stoffe konnten nach Filtration durch Aluminiumoxyd nicht gefunden werden. Wir benutzten zur Chromatographie 2 Systeme. Das zuletzt genannte System hatte bessere Trenneigenschaften, aber den Nachteil, daß es mehr Zeit in Anspruch nahm. Auf diesen PC erschienen die Bitterstoffflecke völlig iso-

liert. (Rf (Lc): 0,66; Rf (Lp): 0,87)
Zu einem raschen und sicheren Nachweis der Bitterstoffe in Pflanzenextrakten gelangten wir durch Verwendung der Dünnschichtchromatographie. Wir stellten in 5 min durch Turbo-Extraktion mit einem elektrischen Rührstab einen methanolischen Auszug von kleinen Mengen (5 g) Pflanzengut her. Der Methylalkohol wurde bei 35° in einem Vakuum-Rotationsverdampfer abgezogen. Der wässrige Rückstand (2-3 ml) wurde durch Filtration vom Chlorophyll befreit. Nach Filtration durch 2 g saures Aluminiumoxyd "Woelm" wurde mit 5 ml Wasser nachgewaschen und auf Dünnschichtplatten chromatographiert. Wir hatten das bereits erprobte Laufmittel Essigsäure 5 % für die Dünnschichtchromatographie auf Zellulose/Gips-Platten angewandt und in 30 min eine sehr gute Trennung der reinen Bitterstoffe erhalten. Die Rf-Werte betrugen 0,33 (Lactucopikrin), 0,79 (Lactucin). Die Rf-Differenz der Bitterstoffe war hier mit 0,46 größer als bei den anderen, oben beschriebenen chromatographischen Systemen.
Bis auf die Rf-Unterschiede zeigen die Dünnschichtchromatogramme im kurzwelligen UV-Licht das gleiche Bild wie die entsprechenden Papierchromatogramme: 1 gelber Fleck am Start und 1-2 blau-fluoreszierende Flecke, die die Bitterstoffflecke zum Teil überlappten. Die Rf-Werte der beim Besprühen mit alkalischer TTC-Lösung entstandenen Flecke waren mit denen identisch, die aus den mitgelaufenen, reinen Vergleichssubstanzen entstanden. Außer den Bitterstoffen und- wie wir später feststellen mußten- ihren Derivaten, konnten so keine anderen Pflanzeninhaltsstoffe mit positiver TTC-Reaktion, gefunden werden.
Später verbesserten wir dieses Verfahren, indem wir dem wässrigen Rückstand des Methanolextraktes vor der Filtration durch saures Aluminiumoxyd zu gleichen Teilen Azeton zusetzten. Aus dieser Lösung wurden durch das Aluminiumoxyd mehr Begleitstoffe adsorbiert. Es erschien nun auf dem DC nur noch ein hellblau fluoreszierender Fleck zwischen den beiden Bitterstoffen. Er stört nicht den Nachweis der Bitterstoffe.

So konnte die Identität der Bitterstoffe Lactucin und Lactucopikrin in methanolischen Auszügen von Lactuca virosa L. durch drei Kriterien bewiesen werden. Diese waren der Rf-Wert, zu dessen Kontrolle stets Reinsubstanzen mitliefen, die rot-violette Fluoreszenz im UV-Licht (254nm) und die positive TTC-Reaktion. Die TTC-Reaktion kann hier als bitterstoffspezifisch gelten, da auf den Chromatogrammen der mit Aluminiumoxyd vorgereinigten Pflanzenextrakte niemals andere Formazan-Flecke auftraten, als solche, die auf Grund ihrer Rf-Werte und UV-Fluoreszenz den Bitterstoffen und ihren Derivaten zugeordnet werden konnten.
Damit waren Störungsmöglichkeiten pflanzlichen Ursprungs bei der quantitativen Bestimmung der Bitterstoffe mit TTC ausgeschlossen.

3. Zusammenfassung und Ergebnisse

Es wurden wässrige und methanolische Lactuca-vir.-Auszüge papierchromatographisch auf Anwesenheit von Lactucin und Lactucopikrin und anderer Stoffe geprüft, die eine positive TTC-Reaktion geben. Außer den Bitterstoffen wurden keine so reagierende Stoffe gefunden.
In wässrigen Auszügen konnte kein Lactucopikrin festgestellt werden, während in methanolischen Pflanzenauszügen beide Bitterstoffe gefunden wurden.
Es wurden 4 chromatographische Verfahren und ihre Verwendungsmöglichkeit beschrieben. Von diesen eignet sich auf Grund des geringen Zeitaufwandes und großen Trenneffektes die Dünnschichtchromatographie auf Zellulose mit 5%iger Essigsäure als Laufmittel am besten für die Untersuchungen von Bitterstoffen.

III. Die quantitative Bestimmung der Bitterstoffe mit Tetrazoliumsalzen

Das für den qualitativen Nachweis der Bitterstoffe Lactucin und Lactucopikrin auf Papierchromatogrammen benutzte 2,3,5,-Triphenyl-tetrazolium-chlorid ist ein farbloser, wasserlöslicher Redox-Indikator. In 0,5-1,0 normalen Laugen wird er durch α-Ketole oder Substanzen mit isosteren Gruppierungen zum roten, lipophilen Triphenyl-formazan reduziert (23).

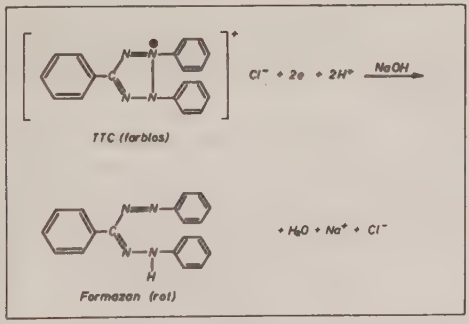


Abb. 2

Für quantitative Bestimmungen des Reduktionsmittels wird entweder nach Detektion das Formazan vom Chromatogramm gelöst (25), oder die Entwicklung des Farbstoffes in seinem Lösungsmittel selbst vorgenommen (26). Eine dritte Möglichkeit ist die Reduktion des TTC in wässrigem Milieu, wobei das Formazan ausfällt. Nach Lösen in einem organischen Lösungsmittel wird die Extinktion der Lösung bestimmt (27).

In neutralem Milieu disproportioniert TTC unter Lichteinfluß zu Triphenyl-formazan und 2,3,-Diphenylen-5-phenyl-tetrazolium-chlorid (28). Die Reduktion in alkalischem Milieu wird durch Lichteinfluß intensiviert; es wird mehr Formazan abgeschieden als bei Reduktion im Dunkeln (29).

Das Triphenyl-formazan ist licht- (28), alkali- (30) und sauerstoffempfindlich (31).
Wie aus den Eigenschaften des Triphenyl-tetrazolium-chlorids und des Triphenyl-formazans zu ersehen ist, sind bei der Verwendung der TTC-Reaktion eine Anzahl von Kautelen zu beachten.

Wir haben zunächst versucht, bekannte Methoden für die Bitterstoff-Bestimmung anzuwenden, nachdem wir festgestellt hatten, daß in den vorgereinigten, methanolischen Lactucavir.-Auszügen nur die Bitterstoffe eine positive TTC-Reaktion gaben.

1. Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Steroidhormon-Bestimmungen mit TTC

Steroidhormone mit einer α-Ketolgruppe können mit der TTC-Methode quantitativ bestimmt werden (32). Wir prüften einige Verfahren und versuchten, diese durch Änderungen für unsere Zwecke brauchbar zu machen. Für die folgenden Untersuchungen verwandten wir ausschließlich Lactucin.

a) Elution von Formazan-Flecken (32)

Wir eluierten die auf Papierchromatogrammen von Lactucin gebildeten Formazan-Flecke mit einer Pyridin-Salzsäure-Mischung und bestimmten die Extinktion der Lösung.
Diese Methode ergab stark schwankende Werte bei Versuchs- und Leerwerten.

b) TTC-Reaktion in Eluaten (26)

Nach papierchromatographischer Trennung werden bei dieser Methode die Substanzen mit Methylglykol vom PC eluiert und in dieser Lösung die TTC-Reaktion durchgeführt.
Diese Methode war nicht brauchbar, da bereits das Lösungsmittel eine positive TTC-Reaktion gab.

c) U.S.P.XVI-Verfahren (33)

Bei dieser Methode wird die Formazan-Entwicklung in aethanolischer Lösung durchgeführt. Als Alkalisierungsmittel dient eine aethanolische Tetramethyl-ammonium-hydroxyd-Lösung. Wir übernahmen die Bestimmungsmethode der U.S.P.XVI mit der Änderung, daß wir die Reaktionszeit von 45 min auf 2,5 h erhöhten. Nach dieser Zeit war jedoch noch nicht die maximale Farbtiefe erreicht. Wir konnten eine Eichgerade aufstellen. Die Mittelwertsabweichungen waren uns zu hoch. Sie betrugen $\pm$ 5 % der Extinktion des Mittelwertes.

2. Versuche zur Änderung des Verfahren 2 - TTC-Reaktion in alkoholischen Lösungen

a) Wahl des Lösungsmittels

Methylglykol, das Lösungsmittel des 2. von uns geprüften Steroid-Bestimmungsverfahrens, wurde von TTC oxydiert. Wir untersuchten einige Lösungsmittel, die sowohl die Bitterstoffe als auch das Formazan lösen, auf ihre Oxydierbarkeit durch TTC: Azeton und Dioxan ließen sich oxydieren; Methanol und Aethanol nicht. Essigester gab eine schwache positive Reaktion. Wir ersetzten darauf bei diesem Verfahren das Methylglykol durch Methanol. Die Methode wurde nun folgendermaßen durchgeführt: 10 - 50 γ Lactucin wurden in 5 ml Methanol gelöst und mit je 0,1 ml einer wässrigen TTC- (2 %ig)und KOH-Lösung (4%ig) versetzt. Nach 20 min Reaktionszeit im Dunkeln wurden die Extinktionsmessungen durchgeführt.

b) Einfluß des Alkalis

Beim Arbeiten nach der oben angegebenen Vorschrift stellten wir drei Fakten fest:

1. Wurde die Kalilauge v o r der TTC-Lösung zur Lactucinlösung gegeben, dann unterblieb die Formazanbildung. - Am Ende dieses Kapitels werden wir, zusammen mit der Begründung der positiven TTC-Reaktion des Lactucins, die Ursache dieser Erscheinung begründen. -

2. Die rote Farbe des Formazan begann 10-15 min nach der Alkalizugabe schwächer zu werden. Dieses unterblieb, wenn wir die Lösung mit Essigsäure ansäuerten oder die Farbentwicklung in einer Mischung von absolutem Alkohol und Essigester vornahmen.
3. Wurde die Laugenkonzentration erhöht (Zugabe von 0,3 u. 0,4 ml statt 0,1 ml), dann nahm die Farbintensität ab. (Die Reaktion wurde in einer Alkohol abs. - Essigester-Mischung durchgeführt.)

c) Bestimmungsmethode mit TTC in Aethanol-Essigester

Unter Beachtung der Reihenfolge des Reagentienzusatzes (zuerst TTC-, dann Alkalilösung) führten wir nun die TTC-Reaktion in 5 ml einer Aethanol abs. - Essigester-Mischung (3:2 v/v) durch. Zum Alkalisieren benutzten wir 0,1 ml n-KOH. Das Farbmaximum war nach unseren Beobachtungen nach 50 min erreicht und blieb im Dunkeln 15 h konstant. Wir stellten mit Lactucinkonzentrationen von 8 - 72 γ eine Eichgerade auf, indem wir die Extinktionen der Formazanlösungen im "ELKO" unter Verwendung des Filters S 49 maßen. Die Abweichungen der Extinktionen vom Mittelwert betrugen ± 8 %.

d) Ergebnisse der Untersuchungen

Bei Überprüfungen von drei Steroid-Bestimmungsverfahren auf Brauchbarkeit zur quantitativen Lactucin-Bestimmung wurde festgestellt, daß wir mit ihnen nicht die von uns geforderte Genauigkeit von ± 2-3 % erzielen konnten. Abänderungen dieser Methoden führten nicht zu besseren Ergebnissen.

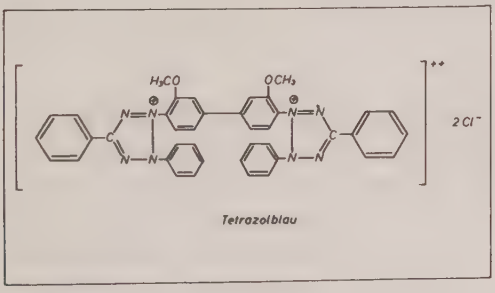
Wir stellten fest, daß bei dem TTC-Verfahren die Alkalikonzentration und die Reihenfolge der Alkalizugabe wichtige Faktoren sind.

Da die Verwendung von Steroid-Bestimmungsverfahren zu keinen Erfolgen führte , beschlossen wir, die Bedingungen der Lactucin-TTC-Reaktion im einzelnen zu untersuchen, um eine spezielle Methode zur Bestimmung der Bitterstoffe zu entwickeln.

3. Untersuchungen mit Blautetrazol

Bei unseren Untersuchungen mit methanolischen Triphenylformazan-Lösungen hatten wir festgestellt, daß die Farbintensität dieser Lösungen rasch abnahm. Sie blieb längere Zeit (14 h) konstant, wenn man nach der Farbbildung die Lösung mit Essigsäure ansäuerte, oder die Farbentwicklung in einer Mischung von Aethanol und Essigester vornahm. In dem Lösungsmittelgemisch nahm die Farbintensität ab, wenn man für die Alkalisierung mehr als 0,2 ml n-KOH benutzte. Es war zu vermuten, daß das Alkali das Formazan zerstörte. R.A. FAIRBRIDGE, K.J.WILLIS und R.G.BOOTH (30) berichteten, daß in wässrigem Isopropanol gelöstes Triphenylformazan in wässrigen Alkalien unstabil ist. In neutraler Lösung konnten sie keine Verminderung der Farbintensität messen.

Das Formazan wird also in alkalischem Milieu zugleich gebildet und zerstört.
Wir hofften, daß diese Zerstörung geringer sein würde, wenn das Formazan gleich nach seiner Bildung dem alkalischen Milieu durch Ausfällung entzogen würde. Als besonders wasserunlöslich wird das Formazan des Tetrazolblau (2,2'-(4,4'-Dimethoxy-diphenylen)-3,3',5,5'-tetraphenyl-ditetrazoliumchlorid)



Tetrazolblau

Abb. 3

beschrieben (34). Seine Farbintensität ist doppelt so groß wie die des Triphenylformazan (35). Diese Eigenschaften veranlaßten uns, für die folgenden Versuche Tetrazolblau zu verwenden.
Auf Grund dieser Überlegungen sollte die Reduktion des Tetrazolblau in wässriger Lösung erfolgen. Nach Beendigung der Formazanabscheidung wollten wir durch Zugabe von Essigsäure das für die Stabilität des Formazan ungünstige alkalische Milieu zum schwach sauren hin verändern und das Formazan in Lösung bringen.

a) Die Löslichkeit des Blauformazan

Wir fällten aus einer wässrigen Tetrazolblau-Lösung das Blauformazan und versuchten durch Zugabe von mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln eine Lösung herzustellen: Methanol, Aethanol, Isopropanol und Dioxan erwiesen sich als unbrauchbar.
Eine Lösung gelang bei Verwendung von Tetrahydrofuran. Dieses wurde als Lösungsmittel bei allen folgenden Versuchen verwendet. Bei der Verwendung für quantitative Messungen wurde es zuvor von Wasser und Peroxyden befreit (39) und frisch destilliert (Kp: 65°-66°).
Da die Bildung und Zerstörung des Formazan im alkalischen Bereich erfolgt, wollten wir, um überschüssiges Alkali zu vermeiden, untersuchen bei welchem pH eine für die quantitative Bestimmung genügend große Formazanabscheidung erfolgt.

b) Die Formazanbildung in Abhängigkeit vom pH

Bei diesen Versuchen wurde zu 1 ml wässriger Lactucinlösung (500 γ) und zu 1 ml wässriger Tetrazolblaulösung (0,1 %) 1 ml Pufferlösung von steigendem pH gegeben. Die Lösungen wurden 1,5 h im Dunkeln aufbewahrt. Anschließend wurde 1 ml Essigsäure (96 %) hinzugegeben, in Tetrahydrofuran gelöst und zu 100 ml aufgefüllt. Die Extinktionen der Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von λ =575 nm bestimmt. Das Maximum der Lichtabsorption wurde bei einer Wellenlänge von 577 nm beobachtet. (Abbildung 4).

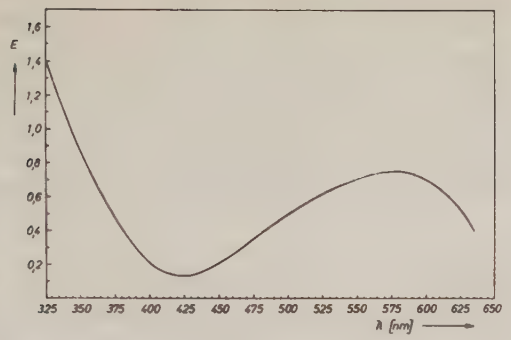


Abb. 4 Absorptionsspektrum der Blauformazanlösung in Tetrahydrofuran
(1500 γ Lactucin in 3 ml Wasser, 1 ml Blautetrazol-Lösung 0,5 %, 1 ml 0,1 N-Pufferlösung 90 min Reaktion bei 55°, 1 ml Eisessig-Tetrahydrofuran zu 100 ml aufgefüllt. 1 cm-Kuvetten)

Unsere Versuche zeigten, daß der Beginn der Tetrazolblau-Reduktion bei pH 9,4 liegt. Von pH 10 - pH 12 nimmt die Formazanabscheidung mit steigendem pH gleichmäßig zu, um sich dann bis pH 13 wesentlich zu verstärken. (Abb. 5)

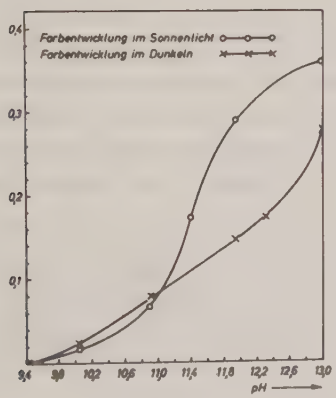


Abb. 5

Abhängigkeit der Formazan-Bildung von Licht und pH

500 γ Lactucin in 1 ml Wasser, 1 ml Blautetrazollösung 0,1 %, 1 ml 0,1 N-Pufferlösung; 90° min Reaktion bei 25°, 1 ml Eisessig, aufgefüllt zu 100 ml mit Tetrahydrofuran. Gemessen in 1 cm-Kuvetten bei 575 nm

In 0,5 - 1 n Laugen erfolgt die Reduktion von TTC durch α-Ketole. Wir wählten mit Rücksicht auf die Alkaliempfindlichkeit des Formazans einen 0,1 N-Boraxpuffer vom pH 12,4, der von G. AVIGAD, R. SELIKSON und S. HESTRIN bei der Bestimmung von Zuckern mit TTC benutzt worden war (27). Trotz der relativ geringen Alkalikonzentration wurden hierbei für unsere Messungen genügende Mengen Formazan abgeschieden.

Der Einfluß des Lichtes auf die Formazanabscheidung ist bekannt (28) (29). Uns interessierte, in welchem Maße die Formazanabscheidung durch den Einfluß des Lichtes erhöht wird.

c) Der Einfluß des Lichtes auf die Formazanabscheidung

Wir wiederholten einen Teil der zuletzt beschriebenen Versuche bei Sonnenlicht.
Bis zum pH 11 glichen die Meßwerte der Extinktionen den Werten der entsprechenden Lösungen, die im Dunkeln entwickelt worden waren. Von pH 11 - pH 13 trat bei den im Licht entwickelten Proben eine wesentlich stärkere Extinktion auf als bei den Dunkelwerten. Bei pH 12 wurde im Licht die doppelte Extinktion des entsprechenden Dunkelwertes gemessen. (Abb. 5)
Da die Erhöhung der Formazanabscheidung der Intensität des eingestrahlten Lichtes proportional ist (29), achteten wir bei den quantitativen Bestimmungen streng auf Lichtausschluß. Die Pufferzugabe zu den Lactucin-Tetrazolblaumischungen erfolgte bei schwachem Rotlicht. Die Farbentwicklung wurde bei völliger Dunkelheit durchgeführt. Der Essigsäurezusatz erfolgte bei Rotlicht, das Lösen des Formazans bei Tageslicht.

Für die Aufbewahrung der für photometrische Messungen vorbereiteten Lösungen des Blauformazans in Tetrahydrofuran war es wichtig zu wissen, ob sich diese Lösungen bei Tageslicht veränderten.

d) Der Einfluß des Tageslichtes auf Blauformazan-Tetrahydrofuranlösungen

Wir bestimmten die Extinktion von Blauformazanlösungen, die drei Tage im Eisschrank aufbewahrt worden waren. Die Extinktionen hatten sich in diesem Zeitraum nicht verändert.

Lösungen, die eine Stunde bei Tageslicht standen, zeigten ebenfalls keine veränderten Extinktionen.
Erst nach eintägiger Aufbewahrung am Fenster konnten wir Extinktionsverringerungen von 8 - 10 % feststellen.

Auf Grund dieser Beobachtungen führten wir das Lösen und Auffüllen mit Tetrahydrofuran bei Tageslicht durch und bewahrten die Lösungen bis zu den Messungen im Dunkeln auf.

Bei Zimmertemperatur erfolgte die Formazanabscheidung nur langsam. Wir versuchten daher, die Reaktion durch Temperaturerhöhung zu beschleunigen. Zugleich mit diesen Untersuchungen stellten wir den Zeitpunkt der Beendigung der Formazanabscheidung fest. Wir wollten sicher sein, daß eine quantitative Umsetzung stattgefunden hatte, aber das Formazan nicht zu lange dem alkalischen Milieu aussetzen.

e) Der Einfluß von Temperatur und Zeit auf die Reaktionsgeschwindigkeit und Formazanabscheidung

Wir untersuchten die Formazanabscheidung quantitativ bei folgenden Temperaturen: 25°, 35°, 45°, 55°, 75° C. Während eines Zeitraumes von 2 Stunden unterbrachen wir in verschiedenen Zeitabständen die Reaktion durch Zugabe von Essigsäure und bestimmten die Formazankonzentration durch Extinktionsmessungen.

Wir stellten fest, daß bei steigenden Temperaturen steigende Mengen Formazan gebildet werden.
Für unsere Bestimmung wählten wir 55° C als Reaktionstemperatur. Bei dieser Temperatur wurde nach 30 min eine genügend hohe Extinktion (E: 0,280; Lactucin-Konzentration: 500 γ in 1 ml Wasser) erhalten, die unter den beschriebenen Reaktionsbedingungen 1 Stunde konstant blieb.

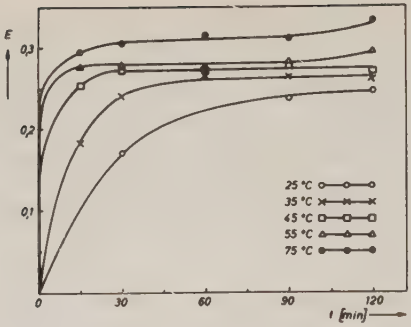


Abb. 6 Abhängigkeit der Formazanbildung von Temperatur und Zeit

500 γ Lactucin in 1 ml Wasser, 1 ml Blautetrazollös.0,1 %, 1 ml 0,1 N-Pufferlös. pH 12,4; 1 ml Eisessig, aufgefüllt zu 100 ml mit Tetrahydrofuran. Gemessen in 1 cm-Kuvetten bei 575 nm.

Auf Grund dieser Untersuchungen wurde bei allen folgenden Versuchen nach 1,5 h die Reaktion durch Essigsäurezusatz beendet.

f) Prüfung der Reaktionsdauer bei höheren Lactucinkonzentrationen

Um sicher zu sein, daß die ermittelte Reaktionszeit auch bei höheren Lactucin-Konzentrationen ausreichend war, unternahmen wir Messungen mit der dreifachen Lactucinmenge (1,5 mg).
In Abständen von einer viertel Stunde wurde die Reaktion durch Zusatz von Essigsäure beendet und die Extinktion der Formazanlösung bestimmt. Nach 1,5 h war das Maximum der Formazanabscheidung erreicht und blieb bis zum Abbruch der Meßreihe (nach insgesamt 2,5 h Reaktionszeit) konstant. Die Extinktion der Blauformazanlösung betrug für 1500 γ Lactucin E=0,799. Da wir aus Gründen der Meßgenauigkeit nicht höhere Extinktionen als E=0,600 messen wollten, genügte somit die ermittelte Reaktionszeit von 1,5 h.

g) Änderung der Blautetrazol-Konzentration

Eine 0,1 %ige Blautetrazol-Lösung ist bei Verwendung von 1 Milliliter Reagenzlösung geeignet für Extinktionsmessungen bis E=0,345. Um höhere Extinktionen messen zu können, wählten wir eine Konzentration von 0,5 % Blautetrazol.

h) Zusammenfassung

Es wurde die Löslichkeit des Blauformazans untersucht, und die Haltbarkeit seiner Lösung in Tetrahydrofuran geprüft. Außerdem war die Abhängigkeit der Reduktion von Tetrazolblau von pH, Licht, Temperatur und Zeit Gegenstand unserer Untersuchungen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten zu einer quantitativen Bestimmungsmethode mit Tetrazolblau führen.
Das Formazan des Blautetrazols konnte im Reaktionsgemisch mit Tetrahydrofuran in Lösung gebracht werden. Diese Lösungen können eine Stunde dem Tageslicht ausgesetzt werden, ohne daß eine Extinktionsänderung auftritt.
Die Reduktion von Blautetrazol durch Lactucin zu Blauformazan nimmt mit steigendem pH und steigender Temperatur zu.

Bei Licht erfolgt eine stärkere Formazanabscheidung als in der Dunkelheit. Wegen der Abhängigkeit der Formazanbildung von der Lichtintensität werden die quantitativen Bestimmungen in der Dunkelheit durchgeführt.

Wir arbeiteten folgende Methode zur quantitativen Bestimmung des Lactucins aus: 1-3 ml einer wässrigen Lactucinlösung (0,5 mg/ml), 1 ml einer 0,5 %igen Blautetrazollösung (wässrig) und 1 ml einer 0,1 N-Borax-Pufferlösung vom pH 12,4 wurden im Thermostaten bei 55° und völliger Dunkelheit in einem verschlossenen 100 ml-Maßkolben zur Reaktion gebracht. Nach 1,5 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Essigsäure (96 %) beendet. Die Puffer- und Essigsäurezugabe erfolgte bei schwachem Rotlicht. Bei Tageslicht wurde der Niederschlag im Maßkolben mit gereinigtem und frisch destilliertem Tetrahydrofuran gelöst. Das Auffüllen zu 100 ml erfolgte im Thermostaten bei 20°. Die Extinktion der Lösung wurde in einer 1 cm-Kuvette in einem Spek-

tralphotometer bei einer Wellenlänge von 575 nm bestimmt. Wurden die Farblösungen nicht sofort zu Messungen verwandt, wurden sie dunkel aufbewahrt.

4. Lactucinbestimmungen mit Blautetrazol in Stickstoffatmosphäre

Nachdem wir die Bedingungen für die Lactucinbestimmung mit Blautetrazol ermittelt hatten, stellten wir bei Messungen zur Aufstellung von Eichgeraden fest, daß die Mittelwertsabweichungen der Extinktionen durchschnittlich ± 4 % betrugen.

Lactucinmenge (γ)	Extinktion (E)	Standardabw.d. Extinktion (σ)	rel.Standardabw.d.Ext.(σ rel)
500	0,293 0,282 0,295 0,288 0,240 0,260 0,276 MW.	± 0,022	± 8,0 %
1000	0,520 0,538 0,520 0,526 MW.	± 0,010	± 1,9 %
1500	0,780 0,795 0,785 0,795 0,789 MW.	± 0,008	± 1,0 %

Tab. 1

Somit hatte das von uns entwickelte Verfahren nur geringe Verbesserung in der Genauigkeit gegenüber dem dritten, von uns untersuchten Verfahren zur Steroid-Hormonbestimmung (U.S.P. XVI) gebracht. C.A. JOHNSON, R. KING und C.VICKERS (31) machten die Beobachtung, daß die großen Abweichungen der Meßwerte bei der Hydrocortison-Bestimmung nach der B.P. 1958, die der U.S.P. XVI-Methode prinzipiell gleicht, vom Sauerstoff verursacht wurden. Nach Stickstoffbegasung er-

hielten die Autoren konstante Werte.

a) Untersuchungen mit Stickstoff

Wir untersuchten die Wirkung von Stickstoff auf unser Verfahren:

Für diese Versuche verwendeten wir nur ein Zehntel der bislang verwandten Lactucin- und Reagentienmengen. Die nun angewandten Lactucinmengen von 30 - 80 γ entsprachen den Bitterstoffmengen, die für die Papierchromatographie verwandt wurden. Wir hatten die Absicht, die Bitterstoffe, die beide Tetrazoliumverbindungen reduzieren, papierchromatographisch zu trennen. Nach der Trennung sollte die Elution der im UV-markierten Bitterstofflecke und die Gehaltsbestimmung mit Tetrazolblau erfolgen.
Es wurden als Reaktionsgefäße graduierte 10 ml-Schliff-Zylinder, statt wie bisher, 100 ml-Maß-Kolben benutzt. Nach Mischen der Reagenz- und Lactucinlösungen wurde in zunehmender Zeitdauer Rein-Stickstoff in die Zylinder geleitet.

Wir stellten ein sprungartiges Ansteigen der Extinktionen der begasten Proben fest. Bei einer Begasungsdauer von 0,5 min stieg die Extinktion um das Dreifache der nicht behandelten Probe. Nach einer Begasungsdauer von 1 min an bis zu 10 min traten nur geringe Extinktionserhöhungen ein.

Die Stickstoffeinwirkungsdauer von 1 min wurde danach als genügend angesehen. So durchgeführte Messungen zeigten Abweichungen von $\pm$ 3 - 4 %.

b) Doppelte Stickstoffbegasung

Da die Verwendung von graduierten 10 ml - Schliff-Zylindern zu Messungenauigkeiten führte, setzten wir unsere Versuche mit der bereits beschriebenen Versuchsanordnung fort. Die Zeit der Stickstoffbegasung wurde nun wegen des größeren Volumens der Reaktionsgefäße (100 ml) auf 15 min erhöht. Um ein Austrocknen der Reaktionslösung zu verhindern, wurde der Stickstoff zuvor durch eine mit Wasser gefüllte Waschflasche geführt. Nach der Begasung wurde bei Rotlicht der Puffer zu der Mischung aus Lactucin- und Blautetrazol-Lö-

sung gegeben, die sich bereits in dem Kolben befunden hatte.
Diese Begasung allein genügte jedoch nicht. Wir machten die Beobachtung, daß die Extinktionen einzelner Proben zu niedrig waren. Bei diesen Proben waren beim Erwärmen auf 55°C die Stopfen durch den Dampfdruck in den Gefäßen gelockert worden. Geringe Lufteinwirkung verursacht demnach Extinktionsverringerungen. Wir begasten daher neben der Mischung aus Lactucin- und Blautetrazol-Lösung im Reaktionsgefäß auch die Puffer-Lösung in ihrem Vorratsgefäß. Nach der Pufferzugabe wurde eine zusätzliche Stickstoffbegasung von 3 min Dauer eingeschaltet.
Wir berücksichtigten außerdem die von G.SCHENCK, H.HUKE und Th.NAUMANN (15) beschriebene Lichtempfindlichkeit von wässrigen Lactucin-Lösungen, indem wir frisch hergestellte Lösungen verwandten oder diese dunkel lagerten. Ihr Gehalt wurde vor Gebrauch durch Bestimmung ihrer Extinktionen bei 256 nm kontrolliert.
Bei Versuchen, die unter doppelter Stickstoff-Begasung durchgeführt worden waren, wurden höhere Extinktionen und geringere Standardabweichungen vom Mittelwert der Extinktionen beobachtet (Tab. 2).

Begasung	Lactucinmenge	Extinkt.d.Bl.-Formaz.-Lsg.	Rel.St.-Abw.
1 X	202 γ	E= 0,164 (MW.aus 7 Mess.)	± 4,3 %
2 X	202 γ	E= 0,207 (MW.aus 6 Mess.)	± 2,4 %

Tab. 2

Bei Messungen zur Errichtung einer Eichgeraden stellten wir fest, daß bei Verwendung größerer Volumina der wässrigen Lactucin-Standardlösung (0,5 mg/ml) die Extinktionen der Blauformazan-Lösung nicht mehr dem Lactucingehalt entsprechend stiegen. Sie waren zu gering. Die Proportionalität war vorhanden, wenn bis zu 2 ml dieser Lactucin-Lösung verwandt wurde. Wir vermuteten, daß bei zu hohem Wasserge-

halt des Reaktionsgemisches eine Lösung und damit verbunden eine leichtere Zerstörbarkeit des Formazans eintritt. Auf den ungünstigen Einfluß des Wassers weist auch H.J. FLACH (36) hin. Wir hielten deshalb bei steigenden Lactucinmengen das Volumen des Reaktionsgemisches konstant auf 3 ml und konnten so eine Eichgerade für 200 - 600 γ Lactucin mit genügender Meßgenauigkeit aufstellen. Die relative Standardabweichung vom Mittelwert der Extinktionen betrug durchschnittlich ± 2 %. (Abb. 7, Tab. 3)

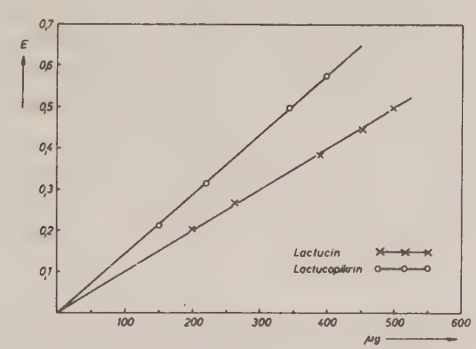


Abb. 7 Eichgeraden für Lactucin und Lactucopikrin
Die Eichgerade für Lactucin wurde unter Verwendung von 1 cm-Kuvetten aufgestellt; für die Lactucopikrinbestimmungen wurden 2 cm-Kuvetten verwandt.

c) Zusammenfassung

Nachdem die Bedingungen für eine quantitative Bestimmung von Lactucin mit Blautetrazol ermittelt worden waren, wurde unter Beachtung der festgestellten Bedingungen eine Eichgerade aufgestellt. Die durchschnittliche , relative Standardabweichung betrug ± 4 %.(Tab. 1)
Durch Begasen mit Stickstoff und Beachtung einer Höchstmenge von Wasser im Reaktionsgemisch konnte die Genauig-

keit und Empfindlichkeit der Methode erhöht werden. Die relative Standardabweichung vom Mittelwert betrug ± 2 % und entsprach damit unseren Anforderungen. (Tab.3; Abb. 7)

5. Die quantitative Bestimmung von Lactucopikrin mit Tetrazolblau

Lactucopikrin ist der p-Hydroxyphenyl-essigsäureester des Lactucins und gibt, ebenso wie dieses, eine positive TTC-Reaktion. Wir konnten daher das von uns für die Bestimmung von Lactucin entwickelte Verfahren mit sehr gutem Erfolg für die Bestimmung von Lactucopikrin anwenden. Zur Messung wurden wässrig-alkoholische Lactucopikrin-Lösungen in den Konzentrationen 150 - 400 γ in einem Milliliter benutzt. Die Lösungen waren wegen der schlechten Wasserlöslichkeit des Lactucopikrins unter Verwendung von 20 % Aethanol hergestellt worden. Die relative Standardabweichung betrug ± 1 %. (Abb. 7; Tab. 4)

6. Die Begründung der Ursache der positiven TTC-Reaktion von Lactucin und des Ausbleibens dieser Reaktion bei alkalischen Lactucin-Lösungen

TTC wird in alkalischem Milieu durch α-Ketole reduziert. Diese werden zu α-Keto-Aldehyden oxydiert, die sich in dem alkalischen Reaktionsmilieu zu α-Hydroxysäuren umlagern (36) (23). (Abb. 8)

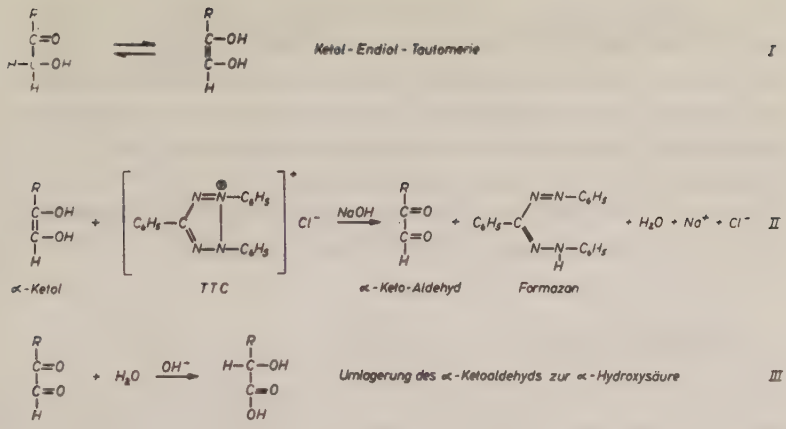


Abb. 8

Durch die Doppelbindung in 3,4,-Position wird das Lactucin zum vinylogen α-Ketol. Die Eigenschaft TTC, zu reduzieren, muß verschwinden, wenn diese Doppelbindung nicht mehr vorhanden ist.
Für unsere Untersuchungen standen uns Dihydrolactucin und Hexahydrolactucin zur Verfügung (Abb. 9). Erwartungsgemäß gab das Dihydrolactucin, bei dem die 3,4-Doppelbindung vorhanden ist, beim Behandeln mit alkalischer TTC-Lösung eine positive Reaktion. Hexahydrolactucin, bei dem sämtliche Doppelbindungen hydriert sind, gab keine Reaktion.

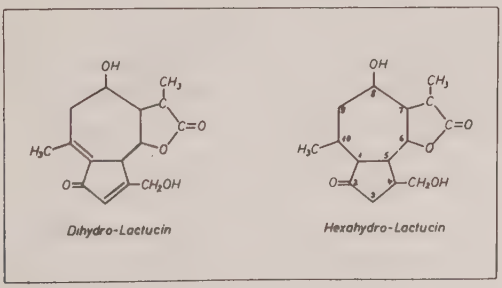


Abb. 9

Der negative Ausfall der TTC-Reaktion in alkalischen Lactucin-Lösungen läßt sich durch eine Beobachtung von D.H.R. BARTON und C.R.NARAYANAN (7) erklären: Die Autoren stellten in alkalischen Lactucin-Lösungen Ameisensäure fest und begründeten ihr Entstehen durch eine Abspaltung des C-Atoms mit der primären Alkoholgruppe.
Hierdurch verliert das Lactucin seinen α-Ketol-Charakter und damit seine Eigenschaft, TTC zu reduzieren.

7. Zusammenfassung und Ergebnisse

Wir versuchten quantitative Bestimmungsmethoden von Steroidhormonen, die auf der TTC-Reaktion basieren, für eine quantitative Bestimmung des Lactucins zu übernehmen. Da deren Genauigkeit uns nicht genügte, untersuchten wir die Bedingungen, unter denen ein anderes Tetrazolium-Derivat, das Blautetrazol, quantitativ reduziert wird und in seiner reduzierten Form, dem Formazan, erhalten bleibt.

Unter Beachtung des Einflusses von Licht, Sauerstoff, Temperatur, Wasserkonzentration und pH konnten wir eine Bestimmungsmethode für Lactucin mit einer relativen Standardabweichung vom Mittelwert der Extinktionen von durchschnittlich $\pm$ 2 % entwickeln.
Diese Methode eignet sich ebenfalls zur quantitativen Bestimmung von Lactucopikrin. Als relative Standardabweichung wurde hierbei ein Durchschnitt von $\pm$ 1 % gemessen.

Wir begründeten die positive TTC-Reaktion des Lactucins mit seinem vinylogen α-Ketol-Charakter und das Ausbleiben dieser Reaktion in alkalischen Lösungen durch eine Veränderung des Lactucinmoleküls.

IV. Die säulenchromatographische Trennung von Lactucin und Lactucopikrin

Für die quantitative Bestimmung mit Blautetrazol mußte eine Trennung der Bitterstoffe durchgeführt werden, da beide die gleiche Reaktion geben. Wir benötigten für diese Bestimmungen Substanzmengen von 100 - 600 γ und benutzten daher die Säulenchromatographie zur Trennung der Bitterstoffe.

1. Kieselgel als Sorbens

An Kieselgel konnten Lactucin und Lactucopikrin nur unvollständig getrennt werden. In einigen Fraktionen befanden sich beide Bitterstoffe. Als Laufmittel benutzten wir Chloroform-Wasser (92:8 v/v) und Wasser. Diese Systeme eignen sich für die dünnschichtchromatographische Trennung von Lactucin, Lactucopikrin und 4-Hydroxyphenyl-essigsäure auf Kieselgel.
Wir nahmen an, daß sich mit stärkeren Sorptionsmitteln als Kieselgel eine bessere Trennung erreichen lassen müßte.

2. Aluminiumoxyd stand. n. Brockmann als Sorbens

Aluminiumoxyd standardisiert nach BROCKMANN wurde von PETER (37) zur Trennung der Bitterstoffe Lactucin und Lactucopikrin benutzt. Bei der Trennung authentischer Bitterstoff-Gemische nach dieser Methode konnte in der Fraktion, die Lactucin enthalten sollte, in geringen Ausbeuten (25 %) nur eine Substanz gefunden werden, die wir jedoch auf Grund ihres Schmelzpunktes und UV-Maximums sowie durch DC-Untersuchungen nicht als Lactucin identifizieren konnten. Diese DC-Untersuchungen erfolgten mit 2 Systemen: außer dem bereits erwähnten Zellulose G /Essigsäure/Wasser - System verwendeten wir das System Kieselgel G /Partridge (einphasig mit Butylazetat). Da die Bitterstoffe auf Kieselgel keine positive TTC-Reaktion geben, detektierten wir hier mit unverdünntem Folin-Ciocalteu-Reagenz in Ammoniak-Atmosphäre und im UV-Licht.

In der Lactucopikrin-Fraktion wurden außer Lactucopikrin noch 3 weitere TTC-positive Stoffe dünnschichtchromatographisch (Zellulose G-Essigsäure 5 %) ermittelt.

Wir nahmen an, daß die Bitterstoffe durch das alkalische Milieu des Aluminiumoxyds stand. n. BROCKMANN (pH der wässrigen Suspension: 10) verändert wurden und prüften die Eignung von neutralem und saurem Aluminiumoxyd in den Aktivitätsstufen I-V. Diese wurden aus dem hochaktiven Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe I durch bis auf 15 % steigenden, Wasserzusatz hergestellt. Diese Sorbentien adsorbierten die Bitterstoffe nur unvollständig und lieferten schlecht reproduzierbare Trennungen. Sie boten aber gegenüber dem nach BROCKMANN aktivierten Aluminiumoxyd den Vorteil, daß sich in den Eluaten außer den Bitterstoffen nur ein einziges Umwandlungsprodukt befand. Neutrale und saure Sorbentien bewirkten demnach eine geringere Veränderung der Bitterstoffe als alkalische.

3. Aluminiumoxyd neutral als Sorbens

In der Annahme, daß das bei der Chromatographie der Bitterstoffe an neutralem und saurem Aluminiumoxyd erhaltene Folgeprodukt, wie die von NAUMANN (15) beobachteten Folgeprodukte des Lactucins, durch Lichteinwirkung aus Lactucopikrin entstanden war, da es eine Phenolreaktion gab, führten wir eine Trennung mit neutralem Aluminiumoxyd im Dunkeln durch.- Neutrales Aluminiumoxyd hat eine etwas bessere Trenneigenschaft als saures. - Die DC-Analyse der Eluate erfolgte ebenfalls im Dunkeln. Trotzdem entstand das Folgeprodukt. Als wir das gleiche Produkt auch in methanolischen Lösungen von Lactucopikrin fanden, die einige Tage im Dunkeln aufbewahrt worden waren, folgerten wir, daß es durch Reaktion des Lactucopikrin mit dem Lösungs- und Elutionsmittel Methanol entstanden sein mußte. Da adsorbierte Substanzen empfindlicher gegen Sauerstoff und Licht sind als gelöste, trat auch hier die Umsetzung schneller ein als in der Lösung. Durch Herabsetzung der Aktivität des neutralen Aluminiumoxyds durch Wasserzusatz versuchten wir die Veränderlichkeit der Bitterstoffe zu verringern. Bei der Verwen-

dung von neutralem Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe I - V mußten wir die Anwesenheit eines 2. Folgeproduktes feststellen, das aus dem Lactucin entstanden war. Da das neutrale Aluminiumoxyd schwach alkalisch ist (pH in wässriger Suspension: 8), versuchten wir durch Verwendung von saurem Oxyd zu einer Trennung ohne gleichzeitige Bildung von Folgeprodukten zu kommen.

4. Aluminiumoxyd sauer als Sorbens

Bei der Prüfung von saurem Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufen I - V konnten wir nur selten die 2 Folgeprodukte beobachten. Es zeigte jedoch den schlechtesten Trenneffekt. Wir versuchten durch Änderung der Lösungsmittel Adsorption und Trennung zu erreichen. In dem bislang zur Adsorption verwendeten Gemisch Methanol/Diaethyläther (1:29 v/v) wurde der Methanol durch Azeton ersetzt. - Azeton hat nach seiner Stellung in der eluotropen Lösungsmittelreihe für Aluminiumoxyd (38) eine weniger herauslösende Wirkung als Methanol.- Aus diesem Gemisch wurden die Bitterstoffe (je 1 mg) an 3 g Aluminiumoxyd sauer bis zur Aktivitätsstufe IV adsorbiert. Das Lactucin wurde durch 200 ml Azeton eluiert, das Lactucopikrin durch 20 ml Methanol. Es traten hierbei keine Folgeprodukte auf. Die Trennung war jedoch nicht vollständig, da einige Azetonfraktionen beide Bitterstoffe enthielten. Durch Erhöhung der Aluminiumoxydmenge von 3 auf 10 g und Auftragen der Bitterstoff-Lösung auf das mit Azeton/Äther eingeschlämmte Sorbens konnte eine gute Trennung erzielt werden.- Bislang wurde die Bitterstoff-Lösung nach PETER (37) auf das trockene Sorbens gegeben.-
Als Adsorptionsrohre verwandten wir braune Glasrohre von 2 cm Ø, denn wir hatten festgestellt, daß Licht fördernd auf die Artefaktbildung wirkt.
Für die Chromatographie von 1 mg Lactucin an 10 g saurem Aluminiumoxyd wurde für eine qualitative Elution 1 l Azeton benötigt; die gleiche Menge Lactucopikrin wurde mit 120 ml Methanol eluiert. Die kurze Zeit der Methanoleinwirkung (20 min) bewirkte keine Veränderung des Bitterstoffes.

Durch Herabsetzen der Aktivität des Aluminiumoxyds auf die Aktivitätsstufe IV wurde keine Verringerung des für die Elution des Lactucins notwendigen Azetonvolumens erreicht. Der Trenneffekt blieb erhalten.
Eine Verringerung der Aluminiumoxydmenge von 10 g auf 5 g verursachte den Verlust des Trenneffektes.

5. Zusammenfassung und Ergebnisse

Es wurden säulenchromatographische Trennungsversuche von Lactucin und Lactucopikrin durchgeführt, mit dem Ziel, eine quantitative Trennungsmethode zu finden, die eine getrennte Bestimmung der Bitterstoffe mit Tetrazolblau ermöglicht.

Als Sorbentien für die Chromatographie gelangten Kieselgel, Aluminiumoxyd standardisiert nach BROCKMANN, sowie neutrales und saures Aluminiumoxyd in den Aktivitätsstufen I - V zur Untersuchung. Grobe Trennungen konnten auf Kieselgel mit Chloroform/Methanol und Wasser durchgeführt werden.

Durch Chromatographie an saurem Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufen I - IV konnten Lactucin und Lactucopikrin quantitativ mit Methanol und Azeton getrennt werden.
Es wurde die Beobachtung gemacht, daß aus den Bitterstoffen in Methanol bereits im Dunkeln und besonders, wenn sie zusammen mit Methanol an Aluminiumoxyd adsorbiert sind, Folgeprodukte entstehen, die ebenfalls TTC reduzieren.

V. Die Veränderungen von Lactucin und Lactucopikrin durch Methanol und Azeton

Bei unseren Untersuchungen zur säulenchromatographischen Trennung von Lactucin und Lactucopikrin hatten wir in methanolischen Lösungen von Lactucopikrin, die einige Tage im Dunkeln aufbewahrt worden waren, dünnschichtchromatographisch das Auftreten eines zweiten Stoffes mit positiver TTC-Reaktion festgestellt. Da für die quantitative Extraktion der Bitterstoffe aus der Lactucapflanze Methanol verwendet werden sollte, war es wichtig zu wissen, ob beide Bitterstoffe in Methanol Veränderungen erleiden und unter welchen Bedingungen die Reaktion erfolgt.

Da uns das Alter der oben erwähnten methanolischen Lactucopikrinlösungen nicht bekannt war, untersuchten wir zunächst, in welcher Zeit die Bildung des Folgeproduktes in der Dunkelheit eintritt.

1. Die Reaktion von Methanol mit Lactucopikrin und Lactucin

a) Die Dunkelreaktion

Wir bewahrten methanolische Lösungen von Lactucopikrin und Lactucin (5 mg/ml) in Reagenzgläsern im Eisschrank auf. Die Untersuchungen der Lösungen erfolgten dünnschichtchromatographisch auf Zellulose G mit 5 %iger Essigsäure als Laufmittel. Die Detektion der Bitterstoffe und ihrer Derivate wurde, wie bisher, mit alkalischer TTC-Lösung bei Raumtemperatur vorgenommen, oder, wie bei zwei Lactucopikrin-Derivaten, im warmen (40-50°) Luftstrom eines Fön. Die erste Prüfung erfolgte nach 9 Stunden, dann wurde eine Woche lang täglich je eine Probe zur Untersuchung entnommen.
In der Dunkelheit konnte nach 9 Stunden noch kein Derivat des Lactucopikrins festgestellt werden. Nach 24 h erschien das uns bereits bekannte Produkt (Rf: 0,66) auf dem DC. Weitere Derivate konnten nach einer Woche nicht beobachtet werden.

Lactucin verändert sich ebenfalls in Methanol. Bei Dunkelheit wurde nach zwei Tagen ein Veränderungsprodukt festgestellt (Rf: 0,90). Dieses blieb die einzige Veränderung während einer Beobachtungszeit von einer Woche.
Wir untersuchten darauf den Einfluß des Lichtes auf die Reaktion des Methanols mit den Bitterstoffen.

b) Die Lichtreaktion

Wir setzten methanolische Lösungen von Lactucopikrin und Lactucin in Reagenzgläsern am Arbeitsplatz dem Tageslicht aus und entnahmen stündlich Proben zur Untersuchung.
Bereits nach einer Stunde war aus Lactucopikrin ein Folgeprodukt entstanden, das auf Grund seines Rf-Wertes (0,66), dem Produkt glich, das in der Dunkelheit aus Lactucopikrin entstanden war. Nach 3 Stunden war ein zweites Folgeprodukt zu beobachten (Rf: 0,5). Dieses gab bei Zimmertemperatur keine positive TTC-Reaktion. Sie trat erst nach leichter Erwärmung ein. Während einer Beobachtungszeit von 5 Stunden wurden keine weiteren Veränderungen festgestellt.

Wurde Lactucin in Methanol bei Tageslicht aufbewahrt, so war nach 2 h neben Lactucin ein Folgeprodukt zu beobachten.
Das Veränderungsprodukt zeigte einen anderen Rf-Wert (0,85) als das Produkt, das aus Lactucin in der Dunkelheit entstanden war (0,90). Es blieb in 5 Stunden das einzige Veränderungsprodukt.
Auf Grund dieser Beobachtungen hielten wir Methanol für ein ungeeignetes Extraktionsmittel für Bitterstoffe und prüften das Verhalten der Bitterstoffe in Azeton bei Tageslicht.

2. Die Veränderung von Lactucopikrin und Lactucin in Azeton bei Tageslicht

Azeton ist ein gutes Lösungsmittel für beide Bitterstoffe. Unter umwandlungsfördernden Bedingungen, wie Licht und Adsorption an hochaktives Aluminiumoxyd, wurden erst nach drei Stunden in Azeton Veränderungsprodukte des Lactucins

festgestellt. In Azeton schienen sich die Bitterstoffe nicht so schnell zu verändern wie in Methanol.
Wir prüften die Brauchbarkeit von Azeton, indem wir Lösungen der Bitterstoffe in Azeton bei Tageslicht stehen ließen und sie stündlich chromatographierten. Die Untersuchungen erstreckten sich über einen Zeitraum von 5 Stunden.

Nach 3 Stunden entstand aus Lactucin ein Derivat mit dem Rf 0,85. Nach 4 Stunden konnte auf dem DC ein Lactucopikrinderivat festgestellt werden, das sich mit alkalischer TTC-Lösung nur bei leichter Wärme detektieren ließ. (Rf: 0,62)

Wegen der langsameren Veränderung der Bitterstoffe in Azeton hielten wir dieses für ein geeigneteres Extraktionsmittel als Methanol.

3. Zusammenfassung und Ergebnisse

Es wurden die Veränderungen von Lactucopikrin und Lactucin in Azeton und Methanol untersucht.
Beide Bitterstoffe setzten sich in Methanol und Azeton zu Derivaten mit positiver TTC-Reaktion um.
In Methanol bildete sich bei Tageslicht in einer Stunde ein Lactucopikrin-Derivat. Nach 3 Stunden entstand ein zweites Produkt, das nur in der Wärme eine positive TTC-Reaktion gab. In der Dunkelheit entstand in Methanol nur ein Produkt. Dieses war erst nach 24 Stunden auf dem DC nachzuweisen.
Aus Lactucin bildete sich bei Tageslicht in Methanol in 2 Stunden ein Folgeprodukt; in der Dunkelheit entstand in 48 Stunden ein Produkt, das auf Grund seines Rf-Wertes nicht mit dem am Licht entstandenen identisch ist.

In Azeton setzten sich die Bitterstoffe bei Licht langsamer um als in Methanol: In 3 Stunden entstand aus Lactucin ein Folgeprodukt. Lactucopikrin wurde in Azeton bei Tageslicht in 4 Stunden verändert. Das Veränderungsprodukt reduzierte TTC nur in der Wärme.

Wir beschlossen Azeton für die Extraktion von Pflanzenmaterial zu benutzen, da sich in ihm die Bitterstoffe langsamer veränderten als in Methanol.

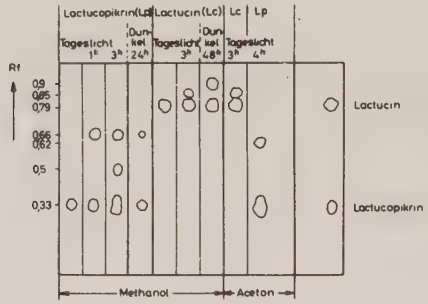


Abb. 10 Dünnschichtchromatogramm der Bitterstoffe und ihrer Derivate

Essigsäure:Wasser 5 : 95 (v/v)
Zellulose G
Detektion: alkalische TTC-Lsg.

VI. Extraktion von Lactucin und Lactucopikrin aus Blättern von Lactuca virosa L. - Trennung der Bitterstoffe

1. Veränderungen der Bitterstoffe in Tinkturen

Bei dünnschichtchromatographischen Untersuchungen von einjährigen Lactuca-Tinkturen, die aus frischen Sprossen und Methanol im Verhältnis 1:5 hergestellt worden waren, beobachteten wir das Auftreten von 4 TTC-reduzierenden Flecken, die nicht den Rf-Wert der Bitterstoffe zeigten.
Da nach unseren Untersuchungen Lactucopikrin bereits in 1 Stunde und Lactucin nach 2 Stunden in Methanol Veränderungen erleiden, waren diese Beobachtungen zu erwarten gewesen. Wir wählten zunächst Azeton als Extraktionsmittel, da auf Grund unserer vorangegangenen Versuche hier die Veränderungen der Bitterstoffe langsamer erfolgten.

2. Herstellung von Trockenextrakten

Da wir wegen der Veränderungen der Bitterstoffe für Versuche im Winter nicht auf Tinkturen zurückgreifen konnten, stellten wir uns aus Blättern von einjährigen Lactuca-vir.-Pflanzen Trockenextrakte her.
Hierzu wurden je 20 g Blätter möglichst lichtgeschützt 3 mal mit 200 ml Azeton 5 min mit einem ESGE-Rührstab zerkleinert. Das Lösungsmittel wurde abgesaugt und bei 25° im Vakuum in einem Umlaufverdampfer bis zu einem wässrigen Rückstand von 10 ml abgezogen. Das Chlorophyll wurde abfiltriert und so lange mit Wasser gewaschen, bis das anfangs gelbe Filtrat farblos war. Die Filtrate wurden bei 25°-30° im Vakuum in einem Umlaufverdampfer abgezogen.
Aus 20 g Blättern wurden jeweils 300 mg eines gelben, blasigen, stark hygroskopischen Trockenextraktes erhalten.

Bei der Herstellung von Trockenextrakten wurde keine erschöpfende Extraktion der Blätter durchgeführt. Wir machten Versuche zur Ermittlung der für eine erschöpfende Extraktion notwendigen Lösungsmittelmengen.

a) Ermittlung der Extraktionsvolumina

20 g Lactuca-virosa-Blätter wurden jeweils mit 200 ml Azeton mit einem ESGE-Stab wirbelextrahiert. Die frischen Blätter wurden zuvor mit einer Schere grob zerkleinert. Es wurde vom Rückstand abgesaugt und das Lösungsmittel bei Lichtabschluß und geringer Wärme (20-30°C) in einem Vakuum-Rotationsverdampfer entfernt. Der wässrige Rückstand wurde durch Aluminiumoxyd gesaugt und kurz mit Azeton nachgewaschen. Das Filtrat wurde abgezogen, und der in Methanol gelöste Rückstand dc untersucht.
Für 20 g frischer Lactuca-vir.-Blätter wurde 1 Liter Azeton benötigt.
Durch Verwendung von so großen Extraktionsvolumina wurde für die erschöpfenden Extraktion von 20 g Lactuca-vir.-Blätterneine Arbeitszeit von 1 Stunde gebraucht. Da wir wegen der möglichen Veränderungen der Bitterstoffe schnell arbeiten und die Einwirkungszeit der Lösungsmittel kurz halten wollten, untersuchten wir unter diesen Aspekten die Extraktion mit Methanol. Mit 600 ml Methanol gelang eine erschöpfende Extraktion. Die Arbeitszeit betrug hier eine halbe Stunde. Da nach unseren Untersuchungen mit reinen Bitterstoffen in Methanol erst nach einer Stunde Veränderungsprodukte nachzuweisen waren, benutzten wir für alle folgenden Extraktionen von Lactuca-Blättern Methanol.

Die bei der Trockenextraktherstellung angewandte Methode der Chlorophyllentfernung durch Ausfällung hat den Nachteil, daß Bitterstoffe mitgefällt werden, die sich so der quantitativen Bestimmung entziehen. Bei Extraktionen für quantitative Bestimmungen wurde das Chlorophyll mit Petroläther ausgeschüttelt.

b) Entfernung des Chlorophylls

Chlorophyll löst sich in Petroläther, mit dem Lactucin und Lactucopikrin nicht aus wässrigen Lösungen ausgeschüttelt werden konnten. Beim Ausschütteln des Chlorophylls aus wässrigen Rückständen von Blattauszügen entstanden schwer brechbare Emulsionen. Wenn wir den wässrigen Rückstand der Extraktion bei einem Volumen von 5 - 10 ml und

die Badtemperatur beim Abziehen des Lösungsmittels im Rotationsverdampfer bei maximal 25°C hielten, entstanden beim Ausschütteln mit Petroläther keine oder leicht brechbare Emulsionen.

c) Entfernung der Bitterstoffe aus der Chlorophyll-Petrolätherphase

Obwohl Lactucin und Lactucopikrin aus wässriger Lösung nicht mit Petroläther ausgeschüttelt werden konnten, enthielt die Petrolätherphase nach der Chlorophyllausschüttelung Bitterstoffe. Durch Säulen- und anschließende Dünnschichtchromatographie wurde ihre Anwesenheit nachgewiesen. Nach dreimaligem Ausschütteln mit 70 ml Wasser konnten im Petroläther keine Bitterstoffe nachgewiesen werden.

d) Zusammenfassung

Es wurden für Winteruntersuchungen Trockenextrakte aus frischen Lactuca-virosa-Blättern hergestellt und die Extraktionsmengen von Methanol und Azeton für eine erschöpfende Extraktion von 20 g Lactucablättern ermittelt. Wegen seines besseren Extraktionsvermögensund der damit verbundenen kürzeren Einwirkungszeit des Lösungsmittels auf die Bitterstoffe wurde Methanol an Stelle von Azeton für alle folgenden Extraktionen verwandt. Bei der Entfernung des Chlorophylls mit Petroläther wurden Bitterstoffe in der Petrolätherphase gefunden. Sie wurden durch dreimaliges Ausschütteln mit Wasser quantitativ dem Petroläther entzogen.

3. Säulenchromatographische Auftrennung des Trockenextraktes

Das für die Trennung der reinen Bitterstoffe ausgearbeitete Verfahren konnte nicht ohne weiteres zur Trennung der Bitterstoffe aus dem Lactuca-Trocken-Extrakt verwendet werden, da sich dieser nicht in Azeton sondern nur in Wasser löste.

a) Chromatographie von Azeton-Wasser-Lösungen des Trockenextraktes

Obwohl die Trennung von Lactucin und Lactucopikrin an Aluminiumoxyd der Aktivitätsstufe IV - das unter Zusatz von 10 % Wasser hergestellt wurde - gelang, bewirkte ein Zusatz von Wasser zur Bitterstoff-Lösung den Verlust des Trenneffektes. So führte die Säulenchromatographie einer Extraktlösung in Azeton, die unter Verwendung von 1 % Wasser zum Lösen des Trockenextraktes hergestellt worden war, zu keiner Trennung. Wegen des Wassergehaltes der Adsorptionslösung wurde Aluminiumoxyd der höchsten Aktivität verwandt (Aktivitätsstufe I.).
Trennungsversuche unter gleichen Bedingungen mit Reinsubstanzen zeigten das gleiche Ergebnis.

b) Essigesterausschüttelung der wässrigen Lösung des Trockenextraktes

Wegen der Unlöslichkeit des Trockenextraktes in Azeton lösten wir ihn in Wasser und versuchten, die Bitterstoffe aus der wässrigen Lösung herauszuschütteln, um diese Lösung dann an Aluminiumoxyd zu chromatographieren. Hierzu erschien uns Essigester sehr geeignet, weil es als Extraktionsmittel für Lactucin und Lactucopikrin aus Pflanzenextrakten bereits beschrieben worden war (18), und es auf Grund seiner Stellung in der eluotropen Lösungsmittelreihe für Aluminiumoxyd ein gutes Adsorptionsmedium für die Bitterstoffe zu sein schien. Für eine quantitative, manuelle Ausschüttelung der Bitterstoffe besaß der Essigester ein zu geringes Lösungsvermögen für Lactucin, das nach 7-facher Ausschüttelung noch in größeren Mengen in der Wasserphase enthalten war. Die wässrige Lösung (100 ml) des Trockenextraktes (300 mg) wurde daher mit Kochsalz versetzt (30 g) und mit Essigester perforiert. Nach 24 Stunden war die Extraktion beendet.

c) Chromatographie der Essigesterlösung

Die Chromatographie der eingeengten Essigesterlösung an Aluminiumoxyd (Akt.I) mit Azeton als Elutionsmittel führte zu keiner Trennung. Es befanden sich nicht nur Lactucin sondern

beide Bitterstoffe in der Azetonfraktion.
Wir führten das Ausbleiben des Trenneffektes auf den Wassergehalt des Essigesters zurück, der 3 % Wasser aufnehmen kann. Nach Abziehen des Essigesters nach der Perforation wurde der Rückstand vorsichtig bei 80° getrocknet, mit Azeton so weit wie möglich aufgenommen und an Aluminiumoxyd chromatographiert. Es wurde keine Trennung erreicht; in der Azetonfraktion befanden sich wieder beide Bitterstoffe.

Der Essigesterrückstand war nicht völlig azetonlöslich. Er löste sich glatt in Wasser, schwer in Methanol. Beim Zusatz von Äther zur Methanollösung des Essigesterrückstandes fiel ein weißer, voluminöser Niederschlag aus. Der Rückstand der von diesem Niederschlag abfiltrierten Lösung löste sich glatt in Azeton.

d) Perforation und Säulentrennung mit Äther

Die Essigesterperforation hatte nicht zu dem erstrebten Ziel, einen azetonlöslichen Bitterstoffextrakt für die Säulentrennung herzustellen, geführt. Die Komponente, die den Rückstand der Essigesterperforation azetonunlöslich machte, war gut wasserlöslich und ätherunlöslich. Durch eine Ätherperforation der wässrigen Lösung des Trockenextraktes hofften wir, diese Komponente nicht zu erfassen. Dieses war der Fall: der Rückstand des für die Perforation verwandten Äthers war glatt azetonlöslich und ließ sich an saurem Aluminiumoxyd chromatographieren. Es wurde eine Trennung der Bitterstoffe erzielt.
Bei der Prüfung der Dauer einer erschöpfenden Perforation brachen wir, als nach 72-stündiger Perforation mit Äther noch kein Ende der Lactucinextraktion festzustellen war, diese Versuche ab. Das Bestimmungsverfahren wäre so zu langwierig und für Serienbestimmungen unbrauchbar geworden.
Aus den Versuchen mit Äther konnten wir sehen, daß der ätherunlösliche Teil des Trockenextraktes Schuld am Versagen der Säulentrennung hatte.

e) Entfernung des ätherunlöslichen Anteils des Trockenextraktes durch Auswaschen

Die Wasserlöslichkeit des ätherunlöslichen Bestandteils des Trockenextraktes veranlaßte uns, ihn mit Wasser aus der Perforations-Essigesterlösung herauszulösen. Der Rückstand der Essigesterlösung konnte nach dem Waschen mit Wasser glatt in Azeton gelöst werden.
Das Waschwasser gab eine positive TTC-Reaktion. DC-Untersuchungen bewiesen die Anwesenheit von beiden Bitterstoffen und ihrer Derivate. Die Anwesenheit von Lactucopikrin in der Wasserphase war sehr erstaunlich: mit der Möglichkeit, Lactucin herauszuwaschen,hatten wir gerechnet und darum das Volumen des Waschwassers gering gehalten (10 % des Essigesters v/v). Die Anwesenheit von Lactucopikrin hatten wir auf Grund seiner geringen Wasserlöslichkeit (1:5000) nicht erwartet. Wir schlossen daraus, daß in dem ätherunlöslichen Teil des Trockenextraktes ein starker Lösungsvermittler enthalten ist.

f) Beseitigung des ätherunlöslichen Anteils durch Ausfällung

Da die Entfernung des ätherunlöslichen Anteils aus der Essigesterlösung der Perforation durch Auswaschen zu Bitterstoffverlusten führte, beseitigten wir ihn durch Ausfällung mit Äther. Der Rückstand der Essigesterlösung wurde in wenig Methanol gelöst oder in Azeton suspendiert. Nach Zugabe von Äther wurde vom Niederschlag abfiltriert. Der Rückstand des Filtrates war glatt azetonlöslich. Das Filtrat der Ätherfällung wurde gleich zur Säulenchromatographie benutzt. Wegen des Äthergehaltes der Adsorptionslösung mußte das Aluminiumoxyd zuvor mit Äther beladen werden. Nach Ablaufen der Adsorptionslösung wurde mit Azeton gewaschen. Diese Fraktionen enthielten außer Lactucin 2 TTC-positive Substanzen.
Die Elution von Lactucopikrin erfolgte abweichend von der Vorschrift für die reinen Bitterstoffe mit einem Gemisch aus gleichen Teilen von Aethanol und Azeton. So wurde die Elution von gelben Farbstoffen vermindert. In der Fraktion war nur Lactucopikrin als TTC-positive Substanz vorhanden.

Die [illegible]ige Lösung der Ätherfällung gab eine positive TTC-Reaktion. Durch eine Reihe von DC-Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß stets nur Lactucopikrin und seine Derivate mitgerissen wurden.
Nachdem uns die Auftrennung von Auszügen aus Lactuca-Blättern in 4 Fraktionen gelungen war, von denen 2 Lactucopikrin und 2 Lactucin enthielten, wäre durch anschließende quantitative Bestimmung der Bitterstoffe mit Blautetrazol der 2. Teil unseres Problems gelöst worden.
Die Anwesenheit von Umsetzungsprodukten in den Lactucinfraktionen und in der Fällung machte jedoch sämtliche Fraktionen der Säulentrennung für eine quantitative Bestimmung unbrauchbar.

g) Untersuchungen über Veränderung der Bitterstoffe bei der Trennung

Unsere Untersuchungen über die Veränderungen der Bitterstoffe in Methanol und Azeton veranlaßten uns, die Ursachen für die Veränderungen der Bitterstoffe nicht bei der Extraktion von Lactucablättern zu suchen, da hier die Bitterstoffe nur eine halbe Stunde mit den Lösungsmitteln in Kontakt kamen.
Wir vermuteten zunächst, daß die Veränderungen durch das bei der Trennung von Pflanzenextrakten verwandte hochaktive Aluminiumoxyd (Akt.I.) verursacht würde und setzten dessen Aktivität auf III herab. Wir erhielten auch hier Derivate.

Der Rückstand des Essigesters nach der Perforation der wässrigen Lösung des Trockenextraktes enthielt ebenfalls Derivate. Diese wurden auch gefunden, als wir unter Umgehung der Essigester-Perforation eine säulenchromatographische Trennung durchführten.
Die Veränderungen entstanden also allein bei der Extraktion der Pflanzenteile. Bei der Verwendung von Azeton und Azeton-Wasser-Mischungen (50 %) wurden sie ebenfalls gefunden. In wässrigen Auszügen wurden keine Derivate gefunden. Die Veränderung der Bitterstoffe erfolgt demnach bei der Extraktion schneller als in der Lösung der reinen Bitterstoffe.

h) Bitterstoffveränderung durch Wärme

Nach den zuvor beschriebenen Untersuchungen muß für eine quantitative Bestimmung der Lactuca-Bitterstoffe die Pflanzenextraktion mit Wasser durchgeführt werden. Wir haben keine Versuche mehr in dieser Richtung durchgeführt, möchten jedoch noch auf einige Beobachtungen hinweisen, die in diesem Zusammenhang von Wichtigkeit sind.

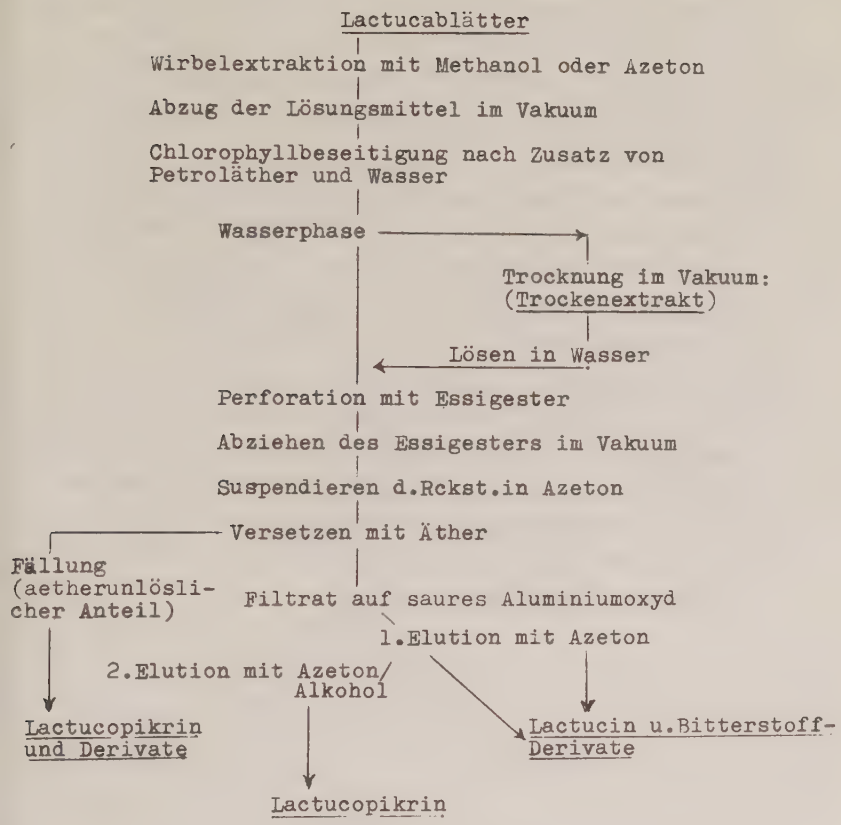
Um mit Wasser eine quantitative Extraktion von Pflanzengut zu erreichen, muß dieses stark zerkleinert werden. Es ist notwendig, eine Wirbelextraktion durchzuführen. Hierbei entsteht Wärme. Bei unseren Extraktionen von Lactuca-Blättern, die wir mit einem ESGE-Stab ausführten, wurden nach 5 Minuten Betriebsdauer Temperaturen bis zu 40° gemessen. Bei der Zerkleinerung von Lactuca-Wurzeln in einer Bosch-Küchenmaschine stieg nach 15 Minuten die Temperatur auf 50° an.
Lactucopikrin ist jedoch wärmeempfindlich: als wir eine wässrige Lactucopikrin-Lösung eine Stunde bei 80° hielten, konnten wir auf dem DC einen 2. TTC-positiven Fleck feststellen. Das gleiche war zu beobachten als wir zur Lösung von Lactucopikrin dieses mit Wasser 5 Minuten kochten.

Es ist also bei der Wirbelextraktion darauf zu achten, daß die Wärmeentwicklung nicht auch zur Entstehung von Bitterstoffderivaten beiträgt.

i) Zusammenfassung

Wir trennten den Trockenextrakt und wässrige Lösungen von Blattextrakten aus Lactuca vir. in vier Fraktionen auf, von denen zwei Lactucopikrin und zwei Lactucin enthielten. Die Auftrennung des Bitterstoffgemisches aus den Pflanzenauszügen gelang nach Perforation des wasserlöslichen Anteils mit Essigester und Chromatographie des Essigesterrückstandes an saurem Aluminiumoxyd nach vorangegangener Ausfällung des ätherunlöslichen Anteils.

Das folgende Schema soll das Prinzip des Trennungsganges wiedergeben:



VII. ZUSAMMENFASSUNG

1. Durch die Verwendung der Dünnschichtchromatographie und Filtration durch saures Aluminiumoxyd gelangten wir zu einer Methode zum schnellen Nachweis der Bitterstoffe Lactucin und Lactucopikrin in Pflanzenteilen von Lactuca vir. L..

2. Der qualitative Nachweis der Bitterstoffe mit TTC wurde zu einer quantitativen Bestimmung mit Tetrazolblau ausgearbeitet.

3. Es wurde eine säulenchromatographische Trennungsmethode gefunden, um die Lactuca-Bitterstoffe einzeln mit Tetrazolblau zu bestimmen.

4. Es gelang die Säulenchromatographie zur Auftrennung von Lactuca-Auszügen anzuwenden.

5. Wir stellten fest, daß Lactucin und Lactucopikrin bei Licht und Dunkelheit in Methanol und Azeton Veränderungen erleiden. Es entstehen Verbindungen, die ebenfalls TTC reduzieren. Diese sind nicht in wässrigen Auszügen zu finden, wohl aber in Zubereitungen, die unter Verwendung von Methanol und Azeton hergestellt wurden.

VIII. Im Laufe unserer Untersuchungen ergaben sich folgende Probleme:

1. Wie ist die quantitative Extraktion von Pflanzenteilen von Lactuca vir. mit Wasser durchzuführen? Nach Lösung dieses Problems wäre dann die bereits uns gestellte Frage nach dem Bitterstoffgehalt der Lactucapflanzen zu verschiedenen Zeiten zu beantworten.

2. Woraus besteht der Lösungsvermittler für die Bitterstoffe, der in der Lactuca-Pflanze enthalten ist? Kann man ihn leicht isolieren oder beschaffen, um mit seiner Hilfe hochkonzentrierte, wässrige Lösungen (aus reinem Lactucin) als Arzneimittel herzustellen, da es doch günstiger ist, von wohldefinierten Substanzen und Mengen auszugehen?

3. Welche Verbindungen entstehen bei der Veränderung von Lactucin und Lactucopikrin in Methanol und Azeton? Die Kenntnisse hierüber könnten dann zu einem besseren Extraktionsmittel als Wasser führen.

C EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herstellung der Substanzen

1. Herstellung des Lactucopikrins

Nach F. WENDT (16) wurden 210 g "Lactuca-Trockenpulver" (11) mit 2100 g Seesand verrieben und in vier Ansätzen mit wasserfreiem Chloroform 30 h in einer Soxhlet-Apparatur extrahiert. Der Rückstand der Chloroformlösung wurde bei 60° im Trockenschrank getrocknet. Es wurden 43 g Extrakt gewonnen.
Je 3 g hiervon wurden mit kaltem Wasser angerieben und zu 3 l Wasser gegeben, das sich kurz vor dem Sieden befand. Auf dem Wasserbad wurde die Suspension 20 min erhitzt. Die Lösung wurde sofort filtriert und in den Kühlraum gestellt. Nach 24 h wurde abgesaugt und die Kristalle bei 60° im Trockenschrank getrocknet. Die Kristalle wurden 4 mal aus der 1000-fachen Menge Wasser umkristallisiert. Fp.: 144-145° unter Zersetzung (Kofler-Heiztisch-Mikroskop).
Nach Filtration über "Aluminiumoxid sauer, Woelm" wurden 3,5 g Kristalle mit Fp. 149-151° (u.Zers.) erhalten. Hierbei wurden je 1 g Lactucopikrin unter vorsichtigem Erwärmen in 20 ml Methanol gelöst und mit 30 mg Aktivkohle geschüttelt. 3 g "Aluminiumoxid sauer, Woelm" wurden in einem Adsorptionsrohr für Säulenchromatographie (Ø 9 mm) mit 100 ml Methanol gewaschen. Die Lactucopikrinlösung wurde durch die Aluminiumoxydsäule gesaugt und diese mit 10 ml Methanol gewaschen. Die Filtrate wurden kurz zum Sieden erhitzt, in 170 ml Wasser von 70° gegossen und kühl gestellt. Nach 24 h wurden die Kristalle abgesaugt.

2. Herstellung des Lactucins

30 l Filtrat, die bei der Lactucopikringewinnung nach F.WENDT (16) anfielen, wurden auf dem Wasserbad auf 600 ml eingeengt. Nach Abkühlung auf 25° wurden 10 ml rauchende Salzsäure hinzugegeben und filtriert. Zu der schwach gelb-

lichen Lösung wurde so lange festes Natriumbikarbonat gegeben, bis sie eine bräunliche Färbung angenommen hatte. Nach Sättigung mit Kochsalz wurden je 300 ml dieser Lösungen einer Kutscher-Steudel-Apparatur 2 Tage mit stark siedendem Aether perforiert. (19)
Die Ausbeute betrug 4,2 g Lactucin, das bei 208-210° unter Zersetzung schmolz. (Kofler-Heiztisch-Mikroskop)

Zur weiteren Reinigung wurde die Methode von W. REUBERT (18) benutzt: 1 g Lactucin wurde in 85 ml heißem Wasser gelöst, mit 30 mg Aktivkohle geschüttelt und langsam durch 3 g "Aluminiumoxid sauer, Woelm" gesaugt, das sich in einem Adsorptionsrohr von 9 mm Durchmesser befand und zuvor mit 100 ml heißem Wasser gewaschen worden war. Nach der Filtration der Lactucinlösung wurde mit 10 ml heißem Wasser nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden 1 Tag im Eisschrank aufbewahrt. Die abgeschiedenen Kristalle wurden abgesaugt und mit Wasser gewaschen.

Fp.: 219-220° unter Zersetzung. (Kofler-Heiztisch-Mikroskop)

II. Beschreibung der Versuchsanordnung

1. Chromatographische Verfahren

a) Papierchromatographie

2 Flecke mit je 30 - 50 γ Bitterstoffe wurden auf 5 cm breite Papierstreifen (Schleicher & Schüll 2043 bM) aufgetragen. Es wurde in Glaszylinder von 7 cm Ø mit Korkenverschluß ohne Sättigung aufsteigend chromatographiert. Als Laufmittel diente Essigsäure-Wasser (95 : 5 v/v) oder Methanol-Wasser (40:60 v/v). Die Steighöhe betrug 20 cm.

Auf Whatmann-I-Papier wurden 50-75 γ Bitterstoffe aufgetragen. Nach 15-stündiger Sättigung wurde absteigend chromatographiert. Die Laufzeit betrug 8 h bei einer Laufstrecke von 30 cm. Als Laufmittel wurde Butylazetat-n-Butanol-Eisessig-Wasser (85:15:40:20 v/v) benutzt.

b) Dünnschichtchromatographie

Auf luftgetrockneten Zellulose-Dünnschichtplatten (MN-Cellulosepulver 300 G, Macherey, Nagel u. Co.) wurden mit 5 %iger Essigsäure 5 - 25 γ Bitterstoffe chromatographiert.
Auf Kieselgel G- DC-Platten (Merck, Darmstadt) wurden 5 - 50 γ Bitterstoffe chromatographiert. Als Laufmittel dienten Chloroform-Methanol (92:8 v/v) und Butylazetat-n-Butanol-Eisessig-Wasser (85:15:40:20)

c) Detektion

Die Bitterstoffe konnten auf Papierchromatogrammen und Dünnschichtchromatogrammen im UV-Licht von 254 nm einer "Universal-UV-Lampe CAMAG TL - 900" durch ihre rotviolette Fluoreszenz erkannt werden.
Für die Papier- und Dünnschichtchromatogramme mit Zellulose-G wurde eine Mischung aus gleichen Teilen einer 4 %igen Natron-Lauge und einer 2 %igen wässrigen 2,3,5,-Tri-phenyl-tetrazoliumchlorid-Lösung verwandt. (18)
Diese Reagenz versagte bei Kieselgel-Platten. Hier wurde mit reinem Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz (Merck, Darmstadt)

besprüht und die besprühten Platten einer NH_3-Atmosphäre ausgesetzt. Lactucopikrin wird in Mengen ab 5 γ, Lactucin ab 50 γ gut sichtbar.

d) Vorreinigen von Pflanzenauszügen zur DC-Untersuchung

5 g Pflanzenteile wurden mit 100 ml Methanol 5 min mit einem ESGE-Stab in einem 400 ml Becherglas zerkleinert. Nach Entfernung des Lösungsmittels und Filtration vom Chlorophyll wurde der wässrige Rückstand mit dem gleichen Volumen Azeton versetzt und die Lösung durch 2 g Aluminiumoxyd sauer (Woelm) filtriert. Mit 5 ml Azeton/Wasser (1+1) wurde nachgewaschen und das gesamte Filtrat im "Büchi"-Vakuumrotationsverdampfer bei 20°-30° Wasserbadtemperatur im Vakuum einer Wasserstrahlpumpe abgezogen. Der Rückstand wurde mit 0,5 ml Azeton soweit wie möglich gelöst und jeweils 0,01 ml zur Dünnschichtchromatographie verwandt.

e) Trennung der Bitterstoffe an saurem Aluminiumoxyd

Je 1 mg der Bitterstoffe wurden in 10 ml Azeton und auf eine Aluminiumoxydsäule gegeben. Die Säulenherstellung erfolgte durch Eintragen von 10 g saurem Aluminiumoxyd (Woelm , Aktivitätsstufe I) in ein mit Azeton gefülltes Adsorptionsrohr aus braunem Glas von 2 cm Ø. Lactucin wurde in 3 - 4 Stunden mit 1 l frischdestilliertem Azeton eluiert, Lactucopikrin mit 120 ml Methanol.

Bei der Säulenchromatographie von ätherhaltigen Pflanzenextraktlösungen wurde Aluminiumoxyd sauer der Aktivitätsstufe I (10 g) in Äther eingetragen. Nach Auftragen der ätherischen Extraktlösung wurde das Lactucin mit 1000 ml Azeton und Lactucopikrin mit 120 ml einer Mischung von Azeton-Äthanol (1+1) eluiert.

2. Lösungen für die quantitative Bitterstoffbestimmung mit Tetrazolblau

a) Herstellung von wässrigen Lactucinlösungen

11 - 60 mg Lactucin wurden mit einer Halbmikrowaage gewogen, in einem 100 ml-Maßkolben (amtlich geeicht) in 5 ml reinem Alkohol gelöst und mit warmen bidestilliertem Wasser aufgefüllt. Nach Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde die Lösung in einem "HAAKE-ULTRA-Thermostaten NBE" eine halbe Stunde bei 20° temperiert und mit ebenfalls dort temperiertem Wasser ergänzt.

b) Herstellung von wässrigen Lactucopikrinlösungen

15-40 mg Lactucopikrin wurden in 20 ml reinem Alkohol gelöst und mit kochendem, bidestilliertem Wasser in einem 100 ml-Maßkolben (eichfähig) aufgefüllt. Es wurde unter fließendem Wasser rasch auf Zimmertemperatur abgekühlt und in 20 min im Thermostaten temperiert und aufgefüllt. Diese Lösungen wurden sofort für die Messungen abpipettiert, da nach 5-10 min Ausfällungen auftraten.

c) Blautetrazollösung

50,0 mg Blautetrazol (Merck, Darmstadt) wurden in 8-9 ml heißem Wasser in Lösung gebracht und nach Abkühlen zu 10 ml ergänzt.

d) Pufferlösung

Durch Mischen von 4 Volumenteilen n/10 Borax-Lösung und 6 Volumenteilen n/10 Natronlauge wurde eine Pufferlösung für das pH 12,4 hergestellt. Die Wasserstoffionenaktivität wurde mit einer Hochalkali-Glaselektrode kontrolliert.

3. Versuchsanordnung für die Begasung mit Stickstoff

Aus einer Gasflasche wurde Rein-Stickstoff durch eine mit Wasser gefüllte und eine leere Waschflasche in eine Reihe von T-Glasrohren geleitet, die miteinander durch Gummischläuche verbunden waren. An die freien Enden der T-Stücke waren mit Gummi Glaskapillaren befestigt, die bis dicht über den Boden der Reaktionsgefäße reichten.

4. Spektralphotometer-Berechnung der Standardabweichungen

Die photometrischen Messungen wurden mit einem "Zeiss Spektralphotometer PMQII" durchgeführt.

Die Standardabweichung (σ) und die relative Standardabweichung (σ rel) wurden nach folgenden Formeln errechnet:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum \cdot (f^2)}{n-1}}$$

$$\sigma \text{ rel} = \frac{\sigma \cdot 100}{MW} \ (\%)$$

f = Abweichung vom Mittelwert

$\sum$ = Summe

n = Anzahl der Meßwerte

MW = Extinktion des Mittelwertes

5. Arbeitsweise und Eichgerade für die Lactucin-Bestimmung

Die Bitterstofflösung (200-600 γ in einem ml) und ein ml Blautetrazollösung (0,5 %ig wässrig) wurden in einem 100 ml-Maßkolben (geeicht) eine viertel Stunde lang mit Stickstoff begast. Zu gleicher Zeit wurde der zur Anwendung gelangende Puffer (Boraxpuffer pH 12,4) eine viertel Stunde mit Stickstoff durchströmt. Dann wurde bei Rotlicht 1 ml Puffer hinzugegeben, 3 min mit Rein-Stickstoff begast, und die Probe 1,5 Stunden bei 55°C im Wasserbad bei völliger Dunkelheit erhitzt. Danach wurde die Probe sofort bei Rotlicht mit 1 ml Eisessig versetzt und rasch abgekühlt. Nach Auffüllen mit bei 20° C im Ultrathermostaten temperierten, frisch über Cu-I-Chlorid destilliertem Tetrahydrofuran wurde im Spektralphotometer die Extinktion der Lösung in 1 cm-Kuvetten bei 575 nm gemessen. Als Ver-

gleichslösung diente Tetrahydrofuran. Das Auffüllen mit Tetrahydrofuran erfolgte bei Tageslicht. Vor der Messung wurden die Lösungen 15 min im Ultrathermostaten bei 20° C gehalten.

Bitterstoffmenge (γ)	Extinktion (E)	Standardabw. d.Extinktion (σ)	rel.Standard-abw.d.Ext. (σ rel)
200	0,203 0,202 0,211 0,212 0,212 0,202 MW: 0,207	± 0,005	± 2,4 %
263	0,271 0,269 0,268 0,275 0,275 MW: 0,272	± 0,003	± 1,1 %
387	0,392 0,385 0,380 0,377 0,384 0,377 MW: 0,383	± 0,006	± 1,6 %
440	0,446 0,438 0,457 MW: 0,447	± 0,009	± 2,2 %
497	0,489 0,503 0,510 0,490 0,485 0,502 0,510 0,510 0,508 MW: 0,501	± 0,010	± 2,0 %

Tab. 3

6. Die Aufstellung einer Eichgeraden für Lactucopikrin

Es wurde bei diesen Messungen nach der Methode zur Lactucinbestimmung gearbeitet. Die Messungen der Extinktionen der Blauformazanlösung erfolgten jedoch in 2 cm-Kuvetten.

Lactucopikrinmenge (γ)	Extinktionen (E)	Standardabw. d.Extinktion (σ)	rel.Stand. abw.d.Ext. (σ rel)
150	0,213 0,215 0,214 0,214 MW: 0,214	± 0,001	± 0,5 %
220	0,318 0,318 0,325 0,320 0,318 0,318 0,315 0,316 MW: 0,319	± 0,003	± 1,0 %
343	0,494 0,494 0,496 0,510 MW: 0,499	± 0,004	± 1,0 %
396	0,572 0,580 0,565 0,590 MW: 0,577	± 0,010	± 2,0 %

Tab. 4

7. Extraktion von Lactuca-Blättern

20 g frische Lactuca-vir.-Blätter wurden mit insgesamt 1 Liter Azeton oder 600 ml Methanol in Anteilen von 200 ml jeweils 5 min mit einem ESGE-Stab wirbelextrahiert. Die Lösungsmittel wurden vom Rückstand abgesaugt und im Rotationsverdampfer bei 20° im Vakuum abgezogen. Der Kolbenrückstand wurde zuerst mit 100 ml Petroläther (DAB 6) zum Teil gelöst und in einen 1-Liter Scheidetrichter überführt. Mit 100 ml Wasser wurden die wasserlöslichen Anteile herausgelöst und mit weiteren 300 ml Petroläther das Chlorophyll herausgeschüttelt. Um die Bitterstoffe quantitativ zu erfassen, wurde die Petroläther-Phase 3 mal mit 70 ml Wasser ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Lösungen wurden entweder bei maximal 30° unter starker Kühlung (Eis u. Viehsalz) der Vorlage im Umlaufverdampfer unter Vakuum zur Trockene gebracht oder gleich für die Trennung weiterverarbeitet. Hierzu wurde die Wasserphase mit Kochsalz gesättigt (30 g auf 100 ml) und 24 Std. mit Essigester ausgezogen.

8. Vorbereitung von Blattauszügen für die Säulentrennung

Nach 24 Stunden wurde der Essigester der Perforation abgezogen und der Rückstand soweit wie möglich in 50 ml Azeton gelöst. Nach Zugabe von 150 ml Äther wurde nach 10 min der Niederschlag abgesaugt, mit 50 ml des gleichen Gemisches nachgespült und das Filtrat zur chromatographischen Trennung verwendet.

D LITERATURVERZEICHNIS

1) A.W. FORST, Münch.med.Wschr. 32, 1251, (1937)
2) G. SCHENCK, Münch.med.Wschr. 32, 1255, (1937)
3) FRONMÜLLER, Deutsche Klinik, 41 (1862)
4) A. BUCHNER, Repert. f. Pharm. 43, 11, (1833)
5) G. SCHENCK, H.GRAF, Arch.Pharmaz. 275, 36, (1937)
6) H.LUDWIG, A.KROMAYER, Arch.Pharmaz.,161, 1 (1862)
7) D.H.R.BARTON, C.R.NARAYANAN, J.Chem.Soc.(London) 1958, 963
8) L. DOLEJS, V.HEROUT und F.SORM, Chem.and.Ind.May 3.530 (1958)
9) K.HOLZER, A. ZINKE, Mh. Chem. 84, 901, (1953)
10) H.MICHL, G.HÖGENAUER, Mh.Chem., 91, 500 (1960)
11) G.SCHENCK, H.GRAF, Archiv.Pharmaz., 274, 537 (1936)
12) K.H. BAUER, K.BRUNNER, Pharmaz.Zentralhalle Deutschland 39, 598 (1936)
13) F. WALTER, Dissertation Freie Universität Berlin 1964
14) A.SCHMITT, Botanisches Arch. 40, 516 (1940)
15) H.E. SELL, Dissertation Freie Universität Berlin 1956
16) TH.NAUMANN, Dissertation Freie Universität Berlin 1964, Naturwissenschaften 50, 734, (1963)
17) F. WENDT, Dissertation Freie Universität Berlin 1952
18) W. REUBERT, Dissertation Freie Universität Berlin 1960
19) E. SPÄTH, G.SCHENCK und W.SCHREBER, Arch.Pharmaz. 277, 203 (1939)
20) H.LUDWIG, Arch. Pharmaz. 100, 129 (1847)
21) G.SCHENCK, W. SCHREBER und H.GRAF, Arch.Pharmaz. 278, 337 (1940)
22) G. RANGNICK, Dissertation Freie Universität Berlin 1954
23) H.MÖHRLE, H.J. ROTH, Arch. Pharmaz. 296, 811 (1963)
24) E. REMPEN, Dissertation Freie Universität Berlin 1955
25) K.WALLENFELS, Naturwissenschaften, 37, 491 (1950)
26) H.SCHMIDT, H.J.STAUDINGER, Biochem. Z., 324, 128, (1953)
27) G.AVIGAD, R.ZELIKSON und S.HESTRIN, Biochem.J.80, 58 (1961)
28) J.HAUSER, D.JERCHEL u. R.KUHN, Chem.B. 82, 195 (1949)
29) Z.S. GIERLACH, A.T.KREBS, Am J.Roentgenol.62, 559 (1949)

30) R.A. FAIRBRIDGE, K.J.WILLIS und R.G. BOOTH, Biochem.J. 49, 423 (1951)
31) C.A. JOHNSON, R.KING und C.VICKERS, Analyst. 85, 714 (1960)
32) H.HOFMANN, H.J.STAUDINGER, Naturwissenschaften, 38, 213 (1951)
33) U.S.P. XVI 333 (1960)
34) KWAN-CHUNG, CHAO-SHING SHENG, M.M.NACHLAS und A.SELIGMAN, J.Am.chem.Soc. 78, 6139 (1956)
35) W.J.MADER, R.R.BUCK, Anal.Chem. 24, 666 (1952)
36) H.J.FLACH, Dissertation Braunschweig 1961 Arch.Pharmaz.295, 460 (1962)
37) K.PETER, Dissertation Freie Universität Berlin 1957
38) Organikum, S. 70,4. Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1964
39) HOUBEN-WEYL, Methoden der Organischen Chemie Bd.I/2. S. 814, Georg Thieme, Stuttgart 1959
40) Homöopathisches Arzneibuch, S. 267, 3. Aufl., Verlag Dr. Wilmar Schwabe, Berlin 1953

LEBENSLAUF

Am 31.8.1934 wurde ich, Otto Gustav Adolf Woköck, als Sohn des Getreidekaufmanns Otto Woköck und seiner Ehefrau Hedwig, geb. Zemke, in Danzig geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Tiegenhof/Westpr. besuchte ich die Oberschule für Jungen Tiegenhof, die Humboldt-Schule in Hannover-Linden, die Mittelschule der Stadt Gifhorn (Hann.) und die Städt. Oberschule für Jungen in Wolfsburg.
Nach dem Abitur 1954 wurde ich Praktikant in der Widukind-Apotheke in Wolfsburg. Nach der pharmazeutischen Vorprüfung (1956 in Celle und Lüneburg) begann ich das Studium der Pharmazie an der Techn. Universität Berlin. Nach dem 2. Semester setzte ich das Studium an der Freien Universität Berlin fort. Im Mai 1959 bestand ich dort die pharmazeutische Prüfung.
Nach der Kandidatenzeit von 9 Monaten in der Widukind-Apotheke in Wolfsburg kehrte ich im April 1960 nach Berlin zurück, um am Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Schenck zu beginnen. Zur gleichen Zeit erhielt ich eine Anstellung am pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin als wissenschaftlicher Hilfsassistent. Im Juni 1960 erhielt ich meine Bestallung als Apotheker. Seit Oktober 1963 bin ich mit der Wahrnehmung der Amtsgeschäfte eines Assistenten beauftragt.